

特表平7-503622

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)4月20日

(51) Int.Cl.*

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 P 21/08

9161-4B

C 0 7 K 16/00

8318-4H

16/18

8318-4H

16/32

8318-4H

9050-4B

C 1 2 N 15/00

Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-514437
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)12月10日
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)8月11日
 (86) 国際出願番号 PCT/US93/12039
 (87) 国際公開番号 WO94/13806
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)6月23日
 (31) 優先権主張番号 990, 263
 (32) 優先日 1992年12月11日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

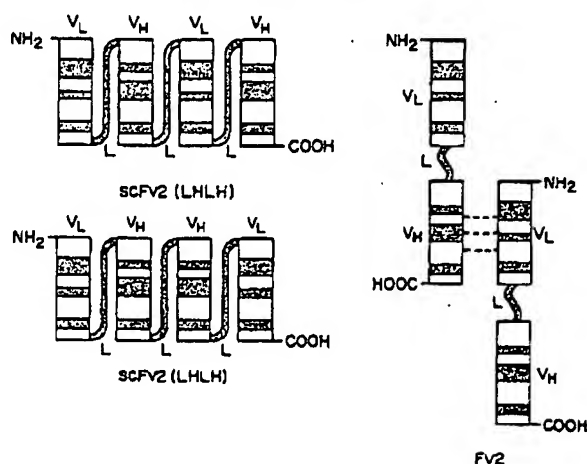
(71) 出願人 ザ ダウ ケミカル カンパニー
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, アボット ロード, ダウ センター 2030
 (72) 発明者 メゼス, ビーター エス.
 アメリカ合衆国, コネチカット 06371, オールドライム, シル レーン 25
 (72) 発明者 ゴーリー, ブライアン ビー.
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, オーチャード ドライブ 3713
 (74) 代理人 弁理士 石田 敏 (外3名)

(54) 【発明の名称】 多価の一本鎖抗体

(57) 【要約】

本発明は、2以上の生物学的に活性な抗原結合部位を有する多価の一本鎖抗体を開示する。この多価の一本鎖抗体は、2本以上の一本鎖抗体を共有結合させるペプチドリンカーを用いることによって作った。各一本鎖抗体は、ペプチドリンカーにより、可変重鎖ドメインに連結されている可変軽鎖ドメインを有する。

共有及び非共有結合型一本鎖Fv多量体の図解



浄書(内容に変更なし)

請求の範囲

1. 2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと

連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

2. この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys
Asp Leu

を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

3. この軽鎖可変領域が、図3に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そしてこの重鎖可変領域が、図5に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

4. この第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

5. 多価の一本鎖抗体をコードするDNA配列であって、この多価の一本鎖抗体が2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;

浄書(内容に変更なし)

明細書

多価の一本鎖抗体

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質にตอบสนองして免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四量体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV_L及びV_Hと称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能をもちあす。

アミノ酸配列データは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)によりフラックされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると推定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは10の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は診

- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、DNA配列。

6. この第一のポリペプチドをコードする配列が図2のそれと実質的に同じであり、そして第二のポリペプチドをコードする配列が図3のそれと実質的に同じである、請求項5記載のDNA配列。

断及び治療剤の両方として有用とされている。モノクローナル抗体は、確立された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエローマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより日常的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断にとってのネズミ抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の種に由来する抗体の定常領域と組合されたものが組換えDNA方法論により作られている。例えば、Sahagenら、J. Immunol., 137: 1066-1074 (1986); Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1987); Nishimuraら、Cancer Res., 47: 999-1005 (1987); 及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987)を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その薬理動力学に影響を及ぼすタンパク質構造全体のうちの主要部分を構成するFc領域を保有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、標的組織に迅速に集中し、且つ結合する抗体様分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さな抗体フラグメントは高めの毛管浸透性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV_Lと一本のV_Hとにより一本鎖抗体フラグメント(scFvs)が作られており、これは8つのCDRを含み、それらはペプチドリンカ

ー (米国特許第 4,946,778号) により連結された V_L-L-V_H ポリペプチドを成しており、ここで L はペプチドリンカーを設けている。 V_L と V_H ドメインが配向 V_H-L-V_L である scFv が米国特許第 5,132,405号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の 2 つの結合部位と比べて scFv は一つのそれを有するため、scFv は 2 以上の結合部位を含む抗体に比べて低い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、且つその抗原認識特性を維持又は高めるため、複数の結合部位を有する scFv の構築体を得ることが有利であろう。加えて、標的組織上の別々のエピトープの認識を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ベース増強を可能とする、又は治療もしくは診断成分の抗体捕獲を可能とする二価特異的である多価 scFv を獲得することが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本の V_L と一本の V_H ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合親和力を維持している多価一本鎖抗体を形成できうことが発見された。一態様において、本発明は抗原に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は 2 本以上の軽鎖可変ドメインと 2 本以上の重鎖可変ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の態様において、本発明は 2 本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。

別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードする DNA 配列を提供し、ここでこの多価の一本鎖抗体は 2 本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。

この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が 2 種類の抗原決定基でありうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

図面の簡単な説明

図 1 は、 $V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$ (LHLH) と $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$ (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型 Fv-一本鎖抗体 (Fv2) を示す。

図 2 は CC49V₁ のヌクレオチド配列を示す。

図 3 は CC49V₁ のアミノ酸配列を示す。

図 4 は CC49V₂ のヌクレオチド配列を示す。

図 5 は CC49V₂ のアミノ酸配列を示す。

図 6 は p49LHLH における CC49-一本鎖抗体 LHLH のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図 7 は p49LHHL における CC49-一本鎖抗体 LHHL のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図 8 はプラスミド pSL301T 及び pSL301HT の構築を示す。

図 9 はプラスミド p49LHHL の構築を示す。

図 10 はプラスミド p49LHLH の構築を示す。

図 11 は CC49IgG、CC49scFv2 及び CC49scFv を用いた、競合因子としてビオチニル化 CC49IgG を用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に組入れる。

核酸、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を略すとき、それらは IUPAC IUB (Commission on Biological Nomenclature) 又は関連分野の実際に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv) 又は「抗体フラグメント」なる語は、 V_L-L-V_H により表わされる、ペプチドリンカー (L) により V_H ドメインに連結された V_L ドメインを含むポリペプチドを意味する。 V_L と V_H ドメインとの順序は逆であってよく、 V_H-L-V_L として表わされるポリペプチドが獲得できうる。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した 2 以上の一本鎖抗体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$ ； $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$ ； $V_H-L-V_L-L-V_H-L-V_L$ ；

又は

$V_H-L-V_L-L-V_L-L-V_H$

の V_L と V_H ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチド間リンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された 1 又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、 V_L と V_H ドメインの数は等しい。

本発明は、

$V_H-L-V_H-L-V_L-L-V_L$ 又は $V_L-L-V_L-L-V_H-L-V_H$

で表示されうる多価の一本鎖抗体も提供する。

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$ (LHLH) 及び $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$ (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図 1 に示す。非共有結合型 Fv-一本鎖抗体 (Fv2) も図 1 に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の軽鎖及び／又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その軽鎖と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。連結されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についての DNA 配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起源が必要とされる。適当な DNA 配列は公共の起源から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって獲得できうる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Services により公開された Kabat の Sequences of Proteins of Immunological Interest 第 4 版 (1991) は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を開示している。遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンする DNA の起

源として、逆転写酵素仲介合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの起源は広範囲にわたるハイブリドーマから獲得できうる。例えば、カタログATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Culture Collection, 20309 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1990) を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用できる。これらの細胞系及びその他の類似の種類が、可変ドメインをコードするmRNAの起源として、又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を獲得するように利用できうる。

抗体の可変領域は、適当な脊椎動物、通常は家畜動物とそして最も好都合にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫原は課題の抗原であるか、又はハプテンであるとき、キーホールリンベットヘモシアニン(KLH)の如きの抗原に対するこのハプテンの抗原性複合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2〜3週間置きの免疫原の1又は数回の繰り返し注射によって好適に実施されうる。通常、最後の負荷の3日後、脾臓を取り出し、そしてmRNAが当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できるようにハイブリドーマを供するための細胞融合に利用する単細胞へと解離する。

課題の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV_L及びV_Hドメインは好ましくは、1990年3月3日に公開されたPCT出願WO 90/04410及び1989年1月26日に公開されたPCT出願WO 89/00692に開示されている、腫瘍関連糖タンパク質72抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT公開WO 90/04410及びWO 89/00692に

する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その個々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように付加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PantollanoらのBiochem., 30, 10117-10125 (1991)に開示されている205Cと称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にあるXho I部位と、他端にあるHind III部位により指定されるコドンで理由に変わらされている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである：

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu。

このリンカーは一般に10〜50のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは12〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15〜25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性な種に由来するレプリコンとコントロール配列とを含む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞の中での発現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保有している。例えば、大腸菌(*E. coli*)はpBR322を用いて容易に形質転換される〔Bolivarら、Gene, 2, 95-(1977)又はSambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版(1989)〕。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できうる。S. セレビジェ(*S. cerevisiae*)又は一般のパン酵母が真核微生物の中で最も

においてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV_L及びV_Hドメインである。CC49のV_Lをコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図1に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Lのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Hをコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Hをコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)は図4に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。V_LとV_Hドメインを連結するための適当なリンカーは、V_LとV_Hドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全抗体のものと構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリンカーは、各イムノグロブリンフラグメントのV_L及びV_Hドメインが三次元構造であって、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、その開示内容を引用することで本明細書に組入れる米国特許第4,946,778号に開示の方法により獲得できうる。この第4,946,778号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できうる。

好ましくは、V_LとV_Hドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリンカーと、2以上のscFvを連結して多価の一本鎖抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配列を有

一般的に利用されているが、数多くのその他の株、例えばピシアバストリス(*Pichia pastoris*)が有用である。多細胞生物、例えばATCCより入手できるSP2/O又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できうる。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドはpSV2neo及びpSV2gpt(ATCC); pSVL及びpKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1/pML2d (International Biotechnology, Inc.)である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための原核及び真核ウィルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入連結部において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域にとって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処理し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前掲に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構築体は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリペプチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために輸送、折りたたみ及び集成過程とつり合う。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって追加の要素が必要とされうる。これらの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその生成物が集成及び折りたたみを助長するために必要とされうる(シャペロン)。

市販されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たす

ように簡単に改変されうる。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選別できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組換え DNA 技術を用いて構築されたベクターにより超換的に形質転換されうる細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、夾雑微生物が培養培地の中で繁殖することを防ぐうえで利用されうる。この態様において、かかる純粋な形質転換細胞の培養物は生存のために誘発された表現型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の標準技術を利用して達成されうる。例えば、もしそれらが培養培地の中に分泌されるなら、この一本鎖の多価抗体は限外濾過により濃縮されうる。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、精製はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで限外濾過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を実行することにより達成されうる。不溶性であり、且つ屈折体 (refractile bodies)、透射針入体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、針入体を単離するための遠心と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-HCl による可溶化、及び再度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって精製できうる。

一本鎖の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば競合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 及びラジオイムノアッセイ (RIA) により測定できうる。

IEP	等電点電気泳動
Kbp	キロ塩基対
LB	Luria-Bertani 培地
Mab	モノクローナル抗体
MES	2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸
MW	分子量
NBT	ニトロブルーテトラゾリウムクロリド
オリゴ	オリゴヌクレオチド
PAG	ポリアクリルアミドゲル
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	リン酸緩衝食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
pSCFV	SCFV をコードする DNA 配列を含むプラスミド
RIGS	ラジオイムノガイド外科
RIT	ラジオイムノ治療
scFv	一本鎖 Fv イムノグロブリンフラグメントモノマー
scFvs	共有結合した一本鎖 Fv イムノグロブリンフラグメントダイマー
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
TBS	トリス緩衝食塩水
トリス	(トリス〔ヒドロキシメチル〕アミノメタン)
TTBS	ツイーン 20 洗浄液
V _H	イムノグロブリン重鎖可変ドメイン
V _L	イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

抗体

CC49: ヒト腫瘍関連糖タンパク質 72 (TAG-72) に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459 として寄託。

本発明の多価の一本鎖抗体は診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大きめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその標的組織により迅速に到達し、そして身体からより迅速に排除される。

診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は 1 又は複数の抗体フラグメントが標的組織に対して特異的であるように、及び/又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように構築されうる。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な特に好都合な薬理組成物も考慮しており、ここでこの標的抗原はしばしば細胞の表層上で発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療剤に当業界に公知の方法によって結合されうる。本発明の薬理組成物は当業界に公知の方法、例えば常用の混合、溶解又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を意図する下記の実施例の考慮により更に明らかにする。

略語

BCIP	5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート
bp	塩基対
Bis-Tris	プロパン (1, 3-ビス〔トリス (ヒドロキシメチル) -メチルアミノ〕プロパン)
BSA	牛血清アルブミン
CDR	相補性決定領域
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
Fv2	非共有一本鎖 Fv ダイマー

CC49PAB: 重鎖の N-末端領域に連結している完全軽鎖より成る CC49 の抗原結合性領域。

CC49scFv: ペプチドリンカーにより連結されている CC49 抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49Fv2: ダイマーを構成するように非共有結合している 2 つの CC49scFv。Fv の後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば CC49Fv6 は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2: 3 つのリンカーにより連結されている、2 本の CC49V_L ドメインと 2 本の V_H ドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V_L (L) と V_H (H) ドメインとを連結し合わせるのに 6 つの可能な順序の組合せがある: LHLH, LHHL, LLHH, HLLH, HLHL 及び HHLL。

プラスミド

pSCPV UHM: 25 のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49 の可変軽鎖と CC49 可変重鎖とより成る scFv についてのコード配列を含むプラスミド。

p49LHLH 又は p49LHHL: CC49scFv2 LHLH 又は LHHL 生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

実施例

一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することで本明細書に組入れる。Sambrook ら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 第 2 版 (1989) 及び Ausubel ら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992) に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

オリゴヌクレオチドの合成及び精製

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、標準の β -シアノエチルホスホラミジット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又はModel 391 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で8~15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその粗混合物を30~40 μ lの滅菌水の中に再懸濁させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲル上での電気泳動の後、オリゴを短波紫外(UV)光を用いて可視化させた。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1mlの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのEDTAの中で65℃で2時間かけて溶離させた。最終精製は、DNAをSep-Pac(商標) C-18カラム(Millipore, Bedford, MA)に適用し、そして結合したオリゴを60%のメタノールで溶離させることによって行った。その溶離液の体積を約50mlに下げ、そしてDNA濃度を260nm (OD₂₆₀)での光学密度を測定することにより決定した。

制限酵素消化

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 又はBoehringer Mannheim (BW, Indianapolis, IN)の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。消化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをエチジウムブロミドで染色し、そのDNAバンドを短波UV光により識別化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ(Union Carbide Corp., Chicago)の中に入れ、そしてMax Submarine電気泳動装置(Hoefer Scientific Instruments,

より測定した。scPv2の結合は、発色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の結合の低下をもたらした。

SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル(20 μ l)を、非還元用サンプル調製バッファSepasol 1(Integrated Separation Systems(ISS), Natick, MA)の中で5分間煮沸することにより調製し、そして10~20%勾配のポリアクリルアミド Daiichi Minigelにその製造者の仕様書(ISS)に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置(ISS)を用い、ゲル当り55mAで、一定の電流で約75分を行った。ゲルをクマジーブリリアントブルーR-250(Bio-Rad, Richmond, CA)の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子量標準品は予め染められており(Mid Range Kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリラーゼb、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オバルブミン、ラクトートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、 β -ラクトグロブリン及びチトクロームC。対応の分子量はそれぞれ95,000、55,000、43,000、36,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュプリケートのゲルも泳動した。電気泳動後、ゲルの一方を陽極バッファ#1(0.3Mのトリス-HCl, pH10.4)の中で15~20分平衡にした。Immobilon-P, PVDF(ポリビニリデンジクロリン)膜(Millipore, Bedford, MA)をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陽極バッファ#1の中で3分平衡にした。Milliblot-SDE装置(Millipore)を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一度陽極バッファ#1を陽極電極面の中央に載せた。Whatman 3MM濾紙のシートを陽極バッファ#1の中に浸し、そしてその電

CA)を用いて溶離させた。サンプル容量をSpeed Vac濃縮器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノール沈殿させ、そして滅菌水の中で再溶解させた。

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら, Can. Res., 46, 850-857 (1986)に実質的に記載の通りに調製したTAG-72抗原を、ポリビニルクロリド96穴マイクロタイタープレート(Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA)のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで31℃で1時間ブロックし、次いで200 μ lのPBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25 μ lの試験抗体及び25 μ lのビオチニル化CC49(1/20,000希釈率の1mg/mlの溶液)をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合したTAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間は、余計な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscPvによる競合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5 μ g/mlのCC49及び10 μ g/mlのCC49Pabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び/又は濃LBとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの抱合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50 μ l(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50 μ lのパラニトロフェニルホスフェート溶液(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を加え、そして発色反応を最低20分行わせた。scPv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA)を用い404~450nmでの光学密度スキャンに

極面の上に滑らかに置いた。陽極バッファ#2(25mMのトリス, pH10.4)の中に浸した別の濾紙を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に載せ、そして最後に陰極バッファ(40mMのグリシン中の25mMのトリスHCl, pH9.4)の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mMの定常電流(初期電圧は8~20ボルトに範囲した)を用いて30分で進められた。

プロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのブロッキング溶液(トリス緩衝食塩水(TBS)中の1%の牛血清アルブミン(BSA)(Sigma, St. Louis, MO))を有する皿の中に入れた。TBSはPierce Chemical (Rockford, IL)より、予備秤量粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を供する。これらの膜を最少限1時間、周囲温度でブロックし、そして20mlずつの0.5%のツイーン20洗浄液(TTBB)を用いて5分間3回洗った。TTBBを調製するには、0.5mlのツイーン20(Sigma)をTBSのリッター当り混合した。使用したブローブ抗体は20mlのビオチニル化FA1D 14溶液とした(10 μ g/20mlの抗体バッファ)。抗体バッファは100mlのTTBS当り1gのBSAを加えることにより作った。周囲温度で30~60分ブローブした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を周囲温度において30~60分、抗体バッファの中で1:500希釈率のアルカリホスファターゼの抱合されたストレプトアビジン(Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) 20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファ(20ml)の中で2分洗った。このバッファは0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMのMgCl₂・H₂O, pH9.8とした。アルカリホスファターゼにとっ

での基質を作るため、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)クロリド(50mg, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、Promegaよりウェスタン発色剤として市販されている。発色のため、それぞれ120μlを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色膜からそれらを水で洗い流した。

ビオチニル化 FAID 14

FAID 14は、CC49に対して特異的な、ATCC No. CRL10256として寄託されているネズミの抗-イデオタイプ抗体(IgG2a, Kアイソタイプ)である。FAID 14を Nygene Protein A アフィニティーカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。製造者のプロトコールに従ったが、ただし溶媒バッファーとして0.1Mのクエン酸ナトリウム、pH 3.0を用いた。固相を1.0Mのトリス-HCl pH 9.0を用いてpH~7に中和した。ビオチニル化反応は下記の通りに設定した。FAID 14(1mg、水の中で100μl)を100μlの0.1MのNa₂CO₃、pH 9.6と混合した。ビオチニル-e-アミノ-カブロン酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mg)を0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Biotin-X-NHS 溶液(20μl)をFAID 14溶液に加え、そして22℃で4時間反応させた。過剰のビオチン及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム(Piscataway, NJ)を用いてゲル濾過により除去した。0.8μl/minの流速で、ビオチニル化FAID 14は18.8minのピークで出現した。このピークを構成する固相をプールし、そして4℃で保存し、そしてCC49V_h及びV_hCDRにより決定

されるCC49イデオタイプを検出するのに用いた。

等電点電気泳動(IEP)

等電点(pI)は、DNASTAR (Madison, WI)を介して入手できるPROTEIN-TITRATEという名のコンピュータープログラムを用いて推定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えてMW値が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計数は0に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にpIを、Isogelアガロース IEPプレート、pH域3~10(FMC Bioproducts, Rockland, ME)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEPを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト(限界)、20mAの電流及び10Wの定常電力とした。等電点泳動は90minで完了した。IEP標準品はBioradより購入した。そのキットはフィコシアニン、β-ラクトグロブリンB、牛炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3レンチルレクテン及びチトクロームCを含み、それらのpI値は4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00並びに8.20及び9.60である。ゲルを、FMCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

CC49抗体の定量

IgG, scPv2の種および単量体scPvを含む精製CC49抗体はすべて、適合している1.0cm光路長の石英製キュベット(Hellma社)およびPerkin-Elmer UV/VIS 分光光度計552A型を用いて、タンパク質希釈液の280nm波長光の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数(E₁)は、各抗体について、下記式を用いて算定した。

$$E_1 = (\text{Trp数}) \times 5,500 + (\text{Tyr数}) \times 1,340 + ((\text{Cys}) 2 \text{数}) \times 150 + (\text{Phe数}) \times 10$$

これらの値は、D.B.Watlauffer, Advances in Protein Chemistry, 17巻、375~378頁に記載されている情報に基づいている。

高性能液体クロマトグラフィー

CC49scPv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にチタンまたはテフロン型配管を用いたLKB HPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型制御器、276nmの吸光度に設定されたUV CORD S II 2238型検出装置および2211型SuperRac fraction collectorで構成されている。

サブユニットのPCRによる製造

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、150ピコグラム(pg)のプラスミド標的(pSCFVUHM); 100ピコモルのプライマー; 1μlのPerkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーウォーク所在のPEC社)のAmpli-Tagポリメラーゼ; 18μlの10mM dNTPおよび10μlの10×緩衝液(両者ともにPECキットに提供されている); ならびに合計容積を100μlにするのに十分な水で構成された反応混合物で行った。PCR反応はメーカーが記載しているのとはほとんど同様にして行った。これらの反応は、PEC 9600型サーモサイクラー(thermocycler)を用いて30サイクル行ったが、その1サイクルは、94℃で20~45秒間のDNAの変性; 52~60℃で0.5~1.5分間のアニーリングおよび72℃で0.5~2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在)の380A型もしくは381型DNA合成器で合成し次いで上記のようにして精製した。

リゲーション

100ngのベクターDNAおよび対応する1:1化学量論的当量のインサートDNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国、

カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在)のT4 DNAリガーゼキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物(全容積20μl)は最初18℃でインキュベートし、次いで一夜4℃まで徐々に冷却した。

形質転換

形質転換は、100μlのStratagene社の大腸菌(E. coli) AG1コンピテント細胞(米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社)を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由来のDNA(1~5μl)を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を続けながらルリアブロス(LB)中で37℃で1時間再生させ、続いて、pSCPVUHM, p49LHLHもしくはp49LHHLに用いる20μg/mlのクロラムフェニコール含有(CAM20)ルリア寒天上にプレートし、またはプラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由来のその後の構築物に用いる100μg/mlアンピシリン(AMP100)ルリア寒天プレート(LB-AMP100)上にプレートした。

大腸菌クローンのスクリーニング

細菌プラスミドは、Promega社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のMagicミニプレッププラスミド製造キットを用いて、高圧(selection pressure)を維持するため適切な薬剤を含有するLBブロス培養物から単離した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

プラスミドの構築

p49LHLHおよびp49LHHLと命名された2種のプラスミドを、多価の一本鎖抗体を製造するために構築した。p49LHLHを含有する宿主細胞は、V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_Hで表すことができるポリペプチドを産生した。ここでV_LとV_HはCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー(L)は、下記SEQ ID NO: 5の配列を有する

25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

p49LHHLを含有する宿主細胞は、 V_L - L - V_H - L - V_L - L - V_L で変換することができるポリペプチドを産生した。ここで V_L と V_H はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびは上記アミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

CC49 V_L - L - V_H - L - V_L - L - V_H (p48LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 6)とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7)を図6に示す。CC49 V_L - L - V_H - L - V_H - L - V_L (p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 8)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 9)を図7に示す。

pSL301HTの構築

pSL301HTの構築を図8に示す。バシラス・リヘニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)のペニシリナーゼ(*penP*)ターミネーターの配列を、*Nhe*Iおよび*Bam*HIで45分間消化することによって、pSCPV UHMと命名されたプラスミドから取出し、電気泳動を行った後、4.5%ポリアクリルアミドゲルから切り取り、電気泳出させ、エタノールで沈降させ、次に、同様に製造されたベクター:pSL301(米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社)中の同じ部位に連結した。pSCPV UHMの製造手順は、1992年8月21日付け出願の米国特許願第07/935,695号に記載されている。なおこの出願の開示事項は本願に援用するものである。一般に、pSCPV UHMは、*penP*プロモーターのヌクレオチド配列; 固有*Nco*I制限部位; CC49 V_L 領域; *Hind*III制限部位; 25個のアミノ酸のリンカー; 固有*Xho*I制限部位; CC49 V_H 領域; *Nhe*I制限部位; *penP*ターミネーター; および*Bam*HI制限部位を含有している(図8参照)。この*penP*プロモーターと*penP*ターミネーターは、Mezesら、*J. Biol. Chem.*, 258巻、

11211~11218頁、1983年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部(3 μ L)を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートし、次いで一夜増殖させたコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。*penP*ターミネーター、インサートを含有するポテンシャルクローンを、Pharmacia社(米国、メリーランド州、ガイサーズバーグ所在)のT7 Quickprime ³²P DNA 標識キットと、Bulowelsら、*Nucleic Acid Research*, 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ波によるコロニー溶解法とともに用いてスクリーニングした。プローブは、*penP*-*Nhe*I-*Bam*HIターミネーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造し使用した。陽性プローブであり、かつ*Bam*HIおよび*Nhe*Iによる消化物由来の207個の塩基対挿入断片(図6に示す1958~2165の塩基対(bp))を含有するクローンをpSL301Tと命名し、次いでCC49VHに対するヌクレオチド配列を含有するpSL301HTを構築するのに選択した。*Nhe*I-*Bam*HI *penP*ターミネーターをpSL301中に配置した理由は、その*Nhe*Iと*Bam*HIの部位の間のポリリンカー領域中に存在するEco47III制限エンドヌクレアーゼ部位を除くためであった。このことは、Eco47III部位が、構造体中に各連続V領域を配置するのにユニークである必要がある V_L と V_H の領域を繞いて構築するため設計された。各V領域がEco47III-*Nhe*I部位に付加されると、Eco47IIIは各場合に破壊されて、ユニーク挿入断片に入ってくる次のEco47III部位を形成した。

V_L 配列は、PCR増幅の標的としてpSCPV UHMを用い、オリゴの5' SCP1と3' オリゴSCP5によってPCRで作製した。SCP1に対するDNA配列(SEQ ID NO: 10)とSCP5に対するDNA配列(SEQ ID NO: 11)は次のとおりである。

SCP1: 5' -TAA CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG-3'

SCP5: 5' -TAA GCT ACC ACCA AGC GCT TAG TGA GCA GAC GGT GAC TGA GCT-3'

下線をつけた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅された V_H DNAを、4%のPAG、電気泳出、エタノールによる沈降および20 μ L水への溶解によって精製した。その V_H 配列を*Xho*Iと*Nhe*Iの制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化され続いて精製されたpSL301Tベクターに対するインサートとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4 μ L)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。CC49 V_H インサートを含有していることを示す候補的クローンを*Nhe*Iおよび*Xho*I消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical (USB) 社(米国、オハイオ州クリーブランド所在)のSequence Kit、および配列決定用プライマーpSL301SEQB(pSL301ベクター中、*Xho*I部位から57bp上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー)とCC49VHPを用いて、DNAの配列決定を行って、CC49 V_H の配列を確認し、pSL301HT中に正しいCC49 V_H 配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドはpSL301-HHLTおよびpSL301-HLHTの両者を構築するときの出発点で使った。使用した配列決定用のオリゴをここに示す。

pSL301SEQB(SEQ ID NO: 12) および CC49 V_H (SEQ ID NO: 13) のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQB: 5' -YCG TCC GAT TAG GCA AGC TTA-3'

CC49VHP: 5' -CAT CAT TTT AAA TAC AAT CAG-3'

実施例1 p49LHHLの構築

pSL301HT(5 μ g)を出発物質として用い、これをEco47IIIおよび*Nhe*Iで消化し、大きい方のベクターフラグメントを精製した。CC49 V_H 挿入フラグメントは、5' オリゴとしてSCP5Cを用い、かつ

3' オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって製造した。SCP5Bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 14)は下記のとおりである。

SCP5B: 5' -TAA TGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC GTT CAG TTG CAG CAG
TCT-G'

またオリゴSCP5Bはリンカーのコーディング領域の一部(SEQ ID NO: 14のbp8~76)を含有している。pSCPV UHM中のCC49VH標的のアニールするよう設計されたオリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp77~80由来のものである。

下線をつけた配列はPspI部位に相当する。得られたPCRインサートを精製し、PspIと*Nhe*Iで消化し、次いでpSL301HT Eco47III-*Nhe*Iベクターとのリゲーション反応に用いた(図7)。コンピテント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物(3 μ L)で形質転換を行うのに用い、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301HHT生成物を示す正しい大きさの*Xho*I-*Nhe*Iインサートを有する2個のクローンの配列をオリゴSQP1を用いて決定し、正しい配列(図7のヌクレオチド1124~1543)を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SQP1のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記のとおりである。

SQP1: 5' -TG ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカーV、サブユニット(bp1544~1963、図7)は、5' オリゴのSCP7bと3' オリゴのSCP8aを用い、かつPCRの標的としてpSCPV UHMを用いて製造した。SCP7bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記のとおりである。

SCP7b: 5' -TAA TGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT
CC

下線をつけたヌクレオチドは FspI 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18)は下記のとおりである。

SCP8a: 5' -TAAA GCT AGC TTT TTA CTT AAG CAC
CAC CTT GGT CCC-3'

下線をつけた最初の一組は NheI 部位に相当し、もう一つの組は AflII 部位に相当する。SCP70のヌクレオチド8〜76はリンカーをコードし(図7のヌクレオチド1544〜1612)、一方V_Lにアニールするヌクレオチド77〜99は図7の1613〜1635に相当する。プライマー SCP8aは、その5'末端の短いテール、NheI 制限部位、終止コドン、AflII 制限部位およびV_Lの最後の21個の塩基を含有している。FspI と NheI による消化の後、この得られた 420bpのインサートを精製して複製 pSL30HHTベクターの NheI と Eco47III の部位に連結し、候補的なクローンを NheI と XhoI でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつ49LFR2(-)とSQPIで配列が決定されて、pSL30IHHL7中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 19)は下記のとおりである。

49LFR2(-): 5' -CTG CTG GTA CCA GGC CAA G-3'

プラスミド pSL30IHHL7を XhoI および NheI で消化し、精製し、得られた1179bp V_H-リンカー-V_H-リンカー-V_Lセグメントを pSCPV UHMに連結して p49LHLHを製造した。なおこの pSCPV UHMは同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応生成物(4 μl 部分)を用いてコンピテント大腸菌 AG1 細胞(Stratagene社)を形質転換し、LBCAM20 寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素地図を有するプラスミドを含有する単クローンを、p49LHLHを含有させるために選択した。p49LHLHは、CC49多価一本鎖抗体 scFv2: V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_H、またはCC49scFv2 (LHLH)のpenPプロモーターとヌクレオチ

ド配列を含有している。

実施例2: p49LHLHの構築

p49LHLHの構築を図11に図式的に示す。リンカーV_Lのサブユニットを5'オリゴのSCP7bと3'オリゴのSCP9で製造した。

SCP9: 5' -TAA AGC TAG CAC CAA GCG CTT AGT TTC
AGC ACC AGC TTG GTC CCA G-3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド8〜76)は図6のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124〜1192に相当する)および図6のV_Lのヌクレオチド1193〜1215に相当する。PCRに対する pSCPV UHM模範(ヌクレオチド77〜99)にアニールした。

SCP8は、NheI 部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)と Eco47III 部位(第二の下線をつけたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次のV領域を受けるための pSL30IHHL7を作るのに必要な制限部位である。SCP8のヌクレオチド18〜23は図6のヌクレオチド1532〜1537(リンカーの最初の2個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド24〜46は、PCRにおけるSCP8のアニール領域である図6に示すヌクレオチド1508〜1531に相当する。プラスミド pSL30IH7を Eco47III と NheI で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予め FspI と NheI で処理され精製された、PCRからのリンカー-CC49V、DNAインサートと連結させる。その連結混合物(3 μl)を用いて大腸菌 AG1 コンピテント細胞を形質転換し、次いで正しい XhoI - NheI の大きさのフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ PENPTSEQ2を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 21)は下記のとおりである。

5' -TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G-3'

配列決定の結果は、得られたpSL30IH7クローン中に PCRの誤まり

と欠失があるということを示した。図6にみられるヌクレオチド1533〜1537に相当する5個の塩基の欠失がみとめられ、そしてTであるべきはずのヌクレオチド1531はDNA配列のデータから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5' ...GAAGCGCTT...であった。

こゝで下線をつけた配列は偶然に Eco47III 部位を形成した。図6のAGCGCTの配列はヌクレオチド1530, 1531, 1532, 1538, 1539および1540に相当する。この誤まりは次のステップで修正され、オリゴSCP8Cの末端に5塩基の欠失を組込むことによってpSL30IHHL7を製造した。

SCP8C: 5' -TAAGCGCTGATGATGCTAAGAAGGACGCCGCAAAAAA
GGACGACGCAAAAAAAGATGATGCAAAAAAGGATCTGCG
AGGTTCACTTGCAGCAGCTGAC-3'

SCP8C中の下線をつけた配列は Eco47III 部位に相当する。PCRにおいて、SCP8Cは5'オリゴとして用いられ一方SCP10は3'オリゴとして用いられ、リンカー CC49V、セグメントが生成する。SCP10のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 23)は下記のとおりである。

SCP10: 5' -TTG TGC TAG CTT TTT ATG AGG AGA CGG TGA
CTG AGG TT-3'

SCP10中の下線をつけた配列は図6のヌクレオチド1958〜1963に見られる NheI 部位に相当する。この場合、PCRインサートはNheI だけで消化され次いで精製される。ベクター(pSL30IHHL7)はEco47III 部位(先に形成されている)および NheI 部位で消化され次いで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3 μl)を使ってコンピテント イー・コリ AG1 細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMP100プレート上にプレートし次いで候補的クローンを XhoI と NheI でスクリーニングした。正しい大きさ

のDNAを有する3個のクローンを得た。これらのクローンのうちの2個は、オリゴ49VLCDR3(+)およびSQPIを用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(49VLCDR3(+))のDWQ ID NO: 24)は下記のとおりである。

49VLCDR3(+): 5' -CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図8のヌクレオチド1533〜1963からの配列が確認され、正しいpSL30IHHL7クローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHLHを製造するために、pSL30IHHL7(5 μg)を NheI と XhoI で消化し、次いでV_L-L-V_L-L-V_H配列を含有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCPV UHM(5 μg)を XhoI と NheI で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部(4 μl)を使ってコンピテント大腸菌 AG1 細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物をLB-CAN20 プレート上にプレートし、次いで p49LHLHに対する代表的なクローンを、正しい制限酵素地図(図10参照)および TAG-72に対する生物活性に基づいて選択した。

実施例3 CC49 scFv2のLHLHとLHLHが共有結合した二量体の精製

CC49の共有結合した一本鎖二量体(scFv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ細胞質の画分を、p49LHLHと p49LHLHの両者の1.0Lの一夜培養物から調製した。要約すると、培養物を250mlづつの4部分に分割し、Sorvall GS-3ロータで10分間5000rpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaClを含有する10mMトリス-HCl pH 7.3からなる100ml中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計100mlの30mMトリス-HCl pH 3で洗浄し、そして一つのチューブにブールした。このチューブに、40w/v%

のスクロースを含有する30mMトリス-HCl pH 7.3(100mL)および10mM EDTA pH 7.5(2.0mL)を添加した。得られた混合物を、時々振盪しながら、室温に10分間保持した。高張性細胞(hypertonic cell)を前記のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mLの氷冷 0.5mM MgCl₂中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら氷上に10分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化し、大腸菌の周辺細胞質の画分を含有する上澄み液を、0.2μmのNalge社(米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在)の濾過装置で濾過することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)のCentriprep 30およびCentricon 30で1.0mLより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLHまたはp49LHHLのクローン由来の濃縮周辺細胞質のショック(shockate)を、Pharmacia社(米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在)のSuperdex 75 HR 10/30 HPLCカラム(予めPBSで平衡化させたもの)に注入した。競合ELISA法で測定する場合、問題の生成物は0.5mL/分の流量で21~24分間放出させた。活性画分をブールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyzer Unit(Pierce Chemical社)を用い、緩衝液を3~4回変えながら8000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.6に対して一夜透析を行った。その試料をPharmacia社のMono Q HR 5/5アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、緩衝液Bとして20mMトリス-HCl pH 7.6+0.5M NaClを用いる勾配プログラムを、1.5mL/minの流量で使用した。問題の生成物は、競合ELISA法で測定する場合、各々3~4分間カラムから放出させた。この時点の画分の、二つのSDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクーマシーブリリアン

トブルーR250で染色し、他方のゲルはウェスタン分析(ブローブ抗体としてビオチニル化 PAID 14を使用)に移されたが、scFv2(LHLHまたはLHHL)の種の計算分子量の単一バンドが、58,239ダルトンの位置に出現した。活性画分は各場合濃縮し、50mM MES pH 5.8に対して一夜透析し、次いでPharmacia社のMono S HR 5/5カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの問題の二つの画分の5と6は、SDS-PAGE法およびELISA法で測定する場合、勾配液の使用が開始される直前に溶出された。したがってこれらの画分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで画分5と6はさらに精製するためにブールした。

Mono Qカラムを活性Mono S画分について再度使用したが使用した緩衝液は20mMトリス-HCl pH 8.0であり、流量は0.8mL/分に低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

等電点電気泳動

構築物の等電点(pI)はDNASTAR社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のコンピュータプログラム Protein-tiltateを使用して予測した。アミノ酸組成、MWおよびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、FMC Bioproducts社(米国、メイン州、ロックランド所在)のIsogel IEPプレートpH範囲3~10を使用して測定した。上記IEPを操作するために、Biorad社(米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在)の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで500V(限定)および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は90分間で完了した。Biorad社のIEP標準品は、フィコシアニン、βラクトグロ

ブリンB、ウシカルボニックアンヒドラーゼ、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラマメレクチンおよびシトクロムCが含有され、pI値はそれぞれ4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50, 7.8, 8.00, 8.20および8.6であった。ゲルはFMCの指示にしたがって染色し脱色した。DNASTARプログラムによって両方のscFv2の種のpI値として8.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の8.9の位置にみとめられた。

IgG, scFv2(LHLHおよびLHHL)のような精製CC49抗体は、280nm波長光の吸光度を分光光学的に測定することによって定量した。モル吸光係数値E_mは各々、先に引用したWetlawferの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG, CC49scFv2LHLH, CC49scFv2LHHLおよびCC49scFvのE_{280nm}(280nm)値はそれぞれ1.49, 1.65, 1.65および1.71であった。

実施例4

CC49scFv2の種のLHLHとLHHLの相対活性を、IgGおよびCOOH末端にFLAGペプチドを有する単量体scFv型と比較した。

パーセント競合(percent competition)を下式によってELISAのデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ競合}-\text{試料競取り値}(OD\ 405-450nm)}{\text{ゼロ競合}-100\%競合} \times 100$$

“ゼロ競合(zero competition)”値は、1%BSAをビオチニル化CC49(3×10⁻¹⁴モル)と1:1比率で混合して測定し、一方100%競合値はビオチニル化CC49IgGと混合したCC49IgGの5μg/mL試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は405nm~450nmで測定した。3回の競取り値の平均値を使

用した。最初に試料(25μL)を、TAG-72でコートしたマイクロリットルプレートに、1.0×10.10モルの結合部位/mLで塗布した。ビオチニル化CC49(4μg/μl 1:20,000に希釈、25μl使用)で試料を1/2濃度に希釈した。連続希釈法(1:2)を行った。両方の形態のscFv2はIgGには等しい(図11参照)。別の試験で、CC49scFv単量体をFabフラグメントと比較した。両者は一価であるが、これらはTAG-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の種に比べて全IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、そのCC49IgGの親と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一層迅速な生体分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存のIgG分子に比べて、本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ癌治療に用いる免疫治療法において腫瘍組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施態様は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の真の適用範囲と思想は以下の特許請求の範囲によって示される。

以上

FIGURE 1

共有及び非共有結合型一本鎖Fv多量体の図解

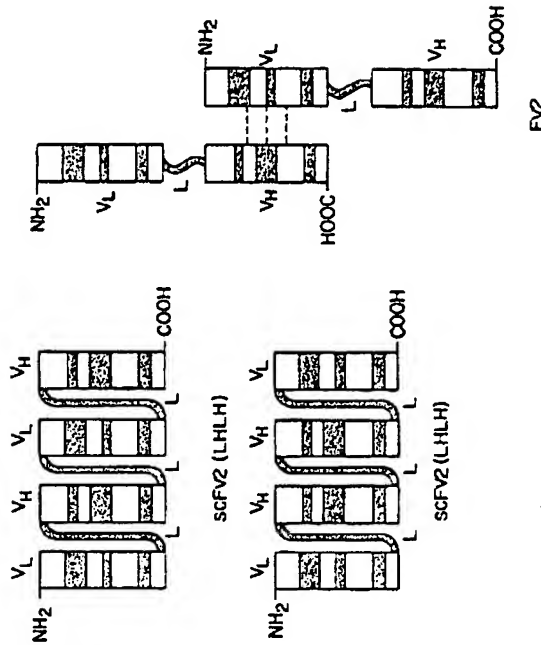


FIG. 2

GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA
 GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC
 CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TCG TAC
 CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TCG
 GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC
 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GPG
 AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT CTG
 ACC TAT CCC CTC ACO TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG CTG CTG
 AAG

FIG. 3

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val
 Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
 Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

FIG. 4

GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT
 GCG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC
 TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TCG GTG AAA CAG AAC CCT GAA
 CAG GGC CTG GAA TCG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT CAT
 GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GGC AAG CCC ACA CTG
 ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GGC TAC GTG CAG CTC AAC
 AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA ACA
 TCC CTG AAT ATG GCC TAC TCG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC
 GTC TCC TCA

FIG. 5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Oly Leu
 Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr
 Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
 Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

特許(内容に変更なし)

FIGURE 6

CCG VL-L-VH-L-VL-L-VH-DNA/RUP-3/配列

5'-C TCA TGT TTG ACA GGT TAT CAT GGA TCA ATT GCA TCA CTT GCC TCC 46
 GTT CAT TTG TCC CCG GTG GAA AGC AGG TCA TCA TTT CTT TCC GAA AAA 94
 ACG GTT GCA TTT AAA TCT TAC ATA TAT AAT ACT TTC AAA GAC TAC ATT 142
 TGT AAG ATT TCA TCT TTG AGT CCG CTG AAA CAT CGT ACG TAC CAA TTA 190
 TTG TTT CGT GAT TGT TCA ACC CAT AAT TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA 238
 GTG CTT CAT CTG GTT ACG ATC AAT CAA ATA TTC AAA CCG AGG GAG ACG 286
 -23
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Thr Ala Ala Ala Gln Gln Leu Leu
 ATT TTG ATG AAA TCA TTG CTT ACG GCA GGC GCT GGT TTA TTA 334
 VL
 Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro 382
 CTC GCT GCC CAA GCA GGC ATG GGC GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA
 10
 Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys 20
 TCC TCC CTA CTT TCA GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AG
 30
 Ser Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala
 TCC ACT CAG ACC CTT TTA TAT ACT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC 478

FIG. 6D

Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala /Tyr Trp Gly Gln Thr Ser
 TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GCA ACC TCA
 250
 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Lys Asp Ala Ala
 GTC ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT
 260
 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Lys Asp Leu Asp Ile
 AAA AAA GAC GAT GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT GTT GAC ATT
 270
 Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys
 GTC ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CTT GTC TCA GTT GCC GAG AAG
 280
 Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn
 GTT ACT TTG ACC TGC AAG TGC AGT CAG AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT
 290
 Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GCG CAG TCT CCT
 300
 310
 320
 330
 340
 350
 360
 370
 380
 390
 400
 410
 420
 430
 440
 450
 460
 470
 480
 490
 500
 510
 520
 530
 540
 550
 560
 570
 580
 590
 600
 610
 620
 630
 640
 650
 660
 670
 680
 690
 700
 710
 720
 730
 740
 750
 760
 770
 780
 790
 800
 810
 820
 830
 840
 850
 860
 870
 880
 890
 900
 910
 920
 930
 940
 950
 960
 970
 980
 990
 1000
 1010
 1020
 1030
 1040
 1050
 1060
 1070
 1080
 1090
 1100
 1110
 1120
 1130
 1140
 1150
 1160
 1170
 1180
 1190
 1200
 1210
 1220
 1230
 1240
 1250
 1260
 1270
 1280
 1290
 1300
 1310
 1320
 1330
 1340
 1350
 1360
 1370
 1380
 1390
 1400
 1410
 1420
 1430
 1440
 1450
 1460
 1470
 1480
 1490
 1500
 1510
 1520
 1530
 1540
 1550
 1560
 1570
 1580
 1590
 1600
 1610
 1620
 1630
 1640
 1650
 1660
 1670
 1680
 1690
 1700
 1710
 1720
 1730
 1740
 1750
 1760
 1770
 1780
 1790
 1800
 1810
 1820
 1830
 1840
 1850
 1860
 1870
 1880
 1890
 1900
 1910
 1920
 1930
 1940
 1950
 1960
 1970
 1980
 1990
 2000
 2010
 2020
 2030
 2040
 2050
 2060
 2070
 2080
 2090
 2100
 2110
 2120
 2130
 2140
 2150
 2160
 2170
 2180
 2190
 2200
 2210
 2220
 2230
 2240
 2250
 2260
 2270
 2280
 2290
 2300
 2310
 2320
 2330
 2340
 2350
 2360
 2370
 2380
 2390
 2400
 2410
 2420
 2430
 2440
 2450
 2460
 2470
 2480
 2490
 2500
 2510
 2520
 2530
 2540
 2550
 2560
 2570
 2580
 2590
 2600
 2610
 2620
 2630
 2640
 2650
 2660
 2670
 2680
 2690
 2700
 2710
 2720
 2730
 2740
 2750
 2760
 2770
 2780
 2790
 2800
 2810
 2820
 2830
 2840
 2850
 2860
 2870
 2880
 2890
 2900
 2910
 2920
 2930
 2940
 2950
 2960
 2970
 2980
 2990
 3000
 3010
 3020
 3030
 3040
 3050
 3060
 3070
 3080
 3090
 3100
 3110
 3120
 3130
 3140
 3150
 3160
 3170
 3180
 3190
 3200
 3210
 3220
 3230
 3240
 3250
 3260
 3270
 3280
 3290
 3300
 3310
 3320
 3330
 3340
 3350
 3360
 3370
 3380
 3390
 3400
 3410
 3420
 3430
 3440
 3450
 3460
 3470
 3480
 3490
 3500
 3510
 3520
 3530
 3540
 3550
 3560
 3570
 3580
 3590
 3600
 3610
 3620
 3630
 3640
 3650
 3660
 3670
 3680
 3690
 3700
 3710
 3720
 3730
 3740
 3750
 3760
 3770
 3780
 3790
 3800
 3810
 3820
 3830
 3840
 3850
 3860
 3870
 3880
 3890
 3900
 3910
 3920
 3930
 3940
 3950
 3960
 3970
 3980
 3990
 4000
 4010
 4020
 4030
 4040
 4050
 4060
 4070
 4080
 4090
 4100
 4110
 4120
 4130
 4140
 4150
 4160
 4170
 4180
 4190
 4200
 4210
 4220
 4230
 4240
 4250
 4260
 4270
 4280
 4290
 4300
 4310
 4320
 4330
 4340
 4350
 4360
 4370
 4380
 4390
 4400
 4410
 4420
 4430
 4440
 4450
 4460
 4470
 4480
 4490
 4500
 4510
 4520
 4530
 4540
 4550
 4560
 4570
 4580
 4590
 4600
 4610
 4620
 4630
 4640
 4650
 4660
 4670
 4680
 4690
 4700
 4710
 4720
 4730
 4740
 4750
 4760
 4770
 4780
 4790
 4800
 4810
 4820
 4830
 4840
 4850
 4860
 4870
 4880
 4890
 4900
 4910
 4920
 4930
 4940
 4950
 4960
 4970
 4980
 4990
 5000
 5010
 5020
 5030
 5040
 5050
 5060
 5070
 5080
 5090
 5100
 5110
 5120
 5130
 5140
 5150
 5160
 5170
 5180
 5190
 5200
 5210
 5220
 5230
 5240
 5250
 5260
 5270
 5280
 5290
 5300
 5310
 5320
 5330
 5340
 5350
 5360
 5370
 5380
 5390
 5400
 5410
 5420
 5430
 5440
 5450
 5460
 5470
 5480
 5490
 5500
 5510
 5520
 5530
 5540
 5550
 5560
 5570
 5580
 5590
 5600
 5610
 5620
 5630
 5640
 5650
 5660
 5670
 5680
 5690
 5700
 5710
 5720
 5730
 5740
 5750
 5760
 5770
 5780
 5790
 5800
 5810
 5820
 5830
 5840
 5850
 5860
 5870
 5880
 5890
 5900
 5910
 5920
 5930
 5940
 5950
 5960
 5970
 5980
 5990
 6000
 6010
 6020
 6030
 6040
 6050
 6060
 6070
 6080
 6090
 6100
 6110
 6120
 6130
 6140
 6150
 6160
 6170
 6180
 6190
 6200
 6210
 6220
 6230
 6240
 6250
 6260
 6270
 6280
 6290
 6300
 6310
 6320
 6330
 6340
 6350
 6360
 6370
 6380
 6390
 6400
 6410
 6420
 6430
 6440
 6450
 6460
 6470
 6480
 6490
 6500
 6510
 6520
 6530
 6540
 6550
 6560
 6570
 6580
 6590
 6600
 6610
 6620
 6630
 6640
 6650
 6660
 6670
 6680
 6690
 6700
 6710
 6720
 6730
 6740
 6750
 6760
 6770
 6780
 6790
 6800
 6810
 6820
 6830
 6840
 6850
 6860
 6870
 6880
 6890
 6900
 6910
 6920
 6930
 6940
 6950
 6960
 6970
 6980
 6990
 7000
 7010
 7020
 7030
 7040
 7050
 7060
 7070
 7080
 7090
 7100
 7110
 7120
 7130
 7140
 7150
 7160
 7170
 7180
 7190
 7200
 7210
 7220
 7230
 7240
 7250
 7260
 7270
 7280
 7290
 7300
 7310
 7320
 7330
 7340
 7350
 7360
 7370
 7380
 7390
 7400
 7410
 7420
 7430
 7440
 7450
 7460
 7470
 7480
 7490
 7500
 7510
 7520
 7530
 7540
 7550
 7560
 7570
 7580
 7590
 7600
 7610
 7620
 7630
 7640
 7650
 7660
 7670
 7680
 7690
 7700
 7710
 7720
 7730
 7740
 7750
 7760
 7770
 7780
 7790
 7800
 7810
 7820
 7830
 7840
 7850
 7860
 7870
 7880
 7890
 7900
 7910
 7920
 7930
 7940
 7950
 7960
 7970
 7980
 7990
 8000
 8010
 8020
 8030
 8040
 8050
 8060
 8070
 8080
 8090
 8100
 8110
 8120
 8130
 8140
 8150
 8160
 8170
 8180
 8190
 8200
 8210
 8220
 8230
 8240
 8250
 8260
 8270
 8280
 8290
 8300
 8310
 8320
 8330
 8340
 8350
 8360
 8370
 8380
 8390
 8400
 8410
 8420
 8430
 8440
 8450
 8460
 8470
 8480
 8490
 8500
 8510
 8520
 8530
 8540
 8550
 8560
 8570
 8580
 8590
 8600
 8610
 8620
 8630
 8640
 8650
 8660
 8670
 8680
 8690
 8700
 8710
 8720
 8730
 8740
 8750
 8760
 8770
 8780
 8790
 8800
 8810
 8820
 8830
 8840
 8850
 8860
 8870
 8880
 8890
 8900
 8910
 8920
 8930
 8940
 8950
 8960
 8970
 8980
 8990
 9000
 9010
 9020
 9030
 9040
 9050
 9060
 9070
 9080
 9090
 9100
 9110
 9120
 9130
 9140
 9150
 9160
 9170
 9180
 9190
 9200
 9210
 9220
 9230
 9240
 9250
 9260
 9270
 9280
 9290
 9300
 9310
 9320
 9330
 9340
 9350
 9360
 9370
 9380
 9390
 9400
 9410
 9420
 9430
 9440
 9450
 9460
 9470
 9480
 9490
 9500
 9510
 9520
 9530
 9540
 9550
 9560
 9570
 9580
 9590
 9600
 9610
 9620
 9630
 9640
 9650
 9660
 9670
 9680
 9690
 9700
 9710
 9720
 9730
 9740
 9750
 9760
 9770
 9780
 9790
 9800
 9810
 9820
 9830
 9840
 9850
 9860
 9870
 9880
 9890
 9900
 9910
 9920
 9930
 9940
 9950
 9960
 9970
 9980
 9990
 10000

FIG. 6B

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
 TGG TAC CAG CAG AAA CCA GCG CAG TCT CCT AAA CTC CTG ATT TAC TCG
 50
 Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
 GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT GCG TTC ACA GGC AGT GCA
 60
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Gln Asp
 TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT GAA GAC
 70
 Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
 CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC AGC TTC
 80
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys
 GGT GCT GCG ACC AAG CTG CTG CTG AAG CTT AGT GCG GAC GAT GCG AAA
 90
 Lys Asp Ala Ala Lys Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys
 AAG GAT GCT GCG AAG AAG AAG GAT GAC GCT AAG AAA GAC GAT GCT AAA AAG
 100
 110
 120
 130
 140
 150
 160
 170
 180
 190
 200
 210
 220
 230
 240
 250
 260
 270
 280
 290
 300
 310
 320
 330
 340
 350
 360
 370
 380
 390
 400
 410
 420
 430
 440
 450
 460
 470
 480
 490
 500
 510
 520
 530
 540
 550
 560
 570
 580
 590
 600
 610
 620
 630
 640
 650
 660
 670
 680
 690
 700
 710
 720
 730
 740
 750
 760
 770
 780
 790
 800
 810
 820
 830
 840
 850
 860
 870
 880
 890
 900
 910
 920
 930
 940
 950
 960
 970
 980
 990
 1000
 1010
 1020
 1030
 1040
 1050
 1060
 1070
 1080
 1090
 1100
 1110
 1120
 1130
 1140
 1150
 1160
 1170
 1180
 1190
 1200
 1210
 1220
 1230
 1240
 1250
 1260
 1270
 1280
 1290
 1300
 1310
 1320
 1330
 1340
 1350
 1360
 1370
 1380
 1390
 1400
 1410
 1420
 1430
 1440
 1450
 1460
 1470
 1480
 1490
 1500
 1510
 1520
 1530
 1540
 1550
 1560
 1570
 1580
 1590
 1600
 1610
 1620
 1630
 1640
 1650
 1660
 1670
 1680
 1690
 1700
 1710
 1720
 1730
 1740
 1750
 1760
 1770
 1780
 1790
 1800
 1810
 1820
 1830
 1840
 1850
 1860
 1870
 1880
 1890
 1900
 1910
 1920
 1930
 1940
 1950
 1960
 1970
 1980
 1990
 2000
 2010
 2020
 2030
 2040
 2050
 2060
 2070
 2080
 2090
 2100
 2110
 2120
 2130
 2140
 2150
 2160
 2170
 2180
 2190
 2200
 2210
 2220
 2230
 2240
 2250
 2260
 2270
 2280
 2290
 2300
 2310
 2320
 2330
 2340
 2350
 2360
 2370
 2380
 2390
 2400
 2410
 2420
 2430
 2440
 2450
 2460
 2470
 2480
 2490
 2500
 2510
 2520
 2530
 2540
 2550
 2560
 2570
 2580
 2590
 2600
 2610
 2620
 2630
 2640
 2650
 2660
 2670
 2680
 2690
 2700
 2710
 2720
 2730
 2740
 2750
 2760
 2770
 2780
 2790
 2800
 2810
 2820
 2830
 2840
 2850
 2860
 2870
 2880
 2890
 2900
 2910
 2920
 2930
 2940
 2950
 2960
 2970
 2980
 2990
 3000
 3010
 3020
 3030
 3040
 3050
 3060
 3070
 3080
 3090
 3100
 3110
 3120
 3130
 3140
 3150
 3160
 3170
 3180
 3190
 3200
 3210
 3220
 3230
 3240
 3250
 3260
 3270
 3280
 3290
 33

抄 録 (内容に変更なし)

FIGURE 7

CC49 VL-L-VH-L-VH-L-VLのDNA及びアミノ酸配列

5'-C TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT CGA TCA ATT CGA TCA CTT CCG TCG 46
 GTT CAT TTG TCC CCG GTG GAA ACG AGG TCA TCA TTT CCT TCC GAA AAA 94
 ACG GTT GCA TTT AAA TCT TAC ATA TAT AAT ACT TTC AAA GAC TAC ATT 142
 TGT AAG ATT TGA TGT TTG AGT CCG GTG AAA GAT COT ACG TAC CAA TTA 190
 TTG TTT CGT GAT TGT TCA ACG CAT AAC ACT GTA GGG ATA GTG GAA AGA 238
 GTG CTT CAT CTG GTT ACG ATC AAT CAA ATA TTC AAA CCG AGG GAG ACG 286
 PEMP2- TAT AAG TTT GCC TCC CTC TG
 -22
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Gly Leu Leu Leu 334
 ATT TTG ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCG GCT GGA TTG TTA TTA
 Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro 382
 CTC GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA
 Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys 430
 TCC TCG CTA CCT GTG TCA GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG

FIG. 7B

Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala 40
 TCC AGT CAG ACG CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC 478
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
 TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT GCT AAA CTG CTC ATT TAC TCG 526
 Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly 70
 GCA TCC GCT ACG GAA TCT CGG GTG CCT GAT GCG TTC ACA GGC AGT GGA 574
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp 80
 TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC ACG AGT GTG AAG ACT GAA GAC 622
 Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Pro Leu Thr Phe 100
 CTG GCA CTT TAT TAC TCT CAG CAG TAT TAT ACC TAT CCC CTC ACG TTC 670
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Lys Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys 120
 GGT CCT GGG ACC AAG CTG GTG AAG CTT ACT GCG GAC GAT GCG AAA 718
 Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys 130
 AAG GAT CCT CCG AAG AAG CAT GAC GCT AAG AAA GAC GAT GCT AAA AAG 766
 TTC CTA CCA CCG TTC TTC CTA THNVL(-)SEQ

FIG. 6F

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn 1726
 TCT GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TTG GTG AAA CAG AAC
 Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp 1774
 CCT GAA CAG GCG CTG GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT
 Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala 1822
 GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GCG AAG GCG ACA CTG ACT GCA
 Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser 1870
 GAC AAA TCC TCC ACG ACT GCG TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr 520
 CAG CAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser *** Nhe I 530
 TCG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTG TCC TCA TAA AAA GCT AGC GAT 1966

FIG. 6G

GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT 2014
 SQP1- TGT AGT AGA ATG TAT TTC AGT
 PENTSEQ2- G TAT TTC AGT GAA CCA CTA GTT
 CAT ATC ATT GTC CCG CAA TGG TGT GGG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT 2062
 AAA GAT CAT GTG AAG AAA AAC GGG AAA ATC GGT CTG CCG GAA AGG ACC 2110
 GCG TTT TTG TCG AAA TCA TAG GCG AAT CCG TTG GAT TGT GAC AAA ATT 2158
 BamH I
 CCG ATC C-3' 2165

FIG. 7E

380 Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser 390
TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC 1534

400 Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp
TCA CTA AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT 1582

410 Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Val Met Ser Gln
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC ATT GGT ATG TCA CAG 1630

420 Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Ser
TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC 1678

430 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr
TGC AAG TCC AGT CAG AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG ALC TAC 1726

440 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT CCA CTA CTG ATT 1774

450 Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
TAC TGG GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CCG TTC ACA GGC 1822

460 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr
AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT 1870

470 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu
GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TCT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC 1918

480 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys ***
ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTT AAG TAA AAA GCT AGC GAT 1966

490 GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT 2014

500 Ser Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys ***
GAT ATC ATT GTC CCG CAA TGG TGT GGG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT 2062

510 AAA GAT CAT GTG AAG AAA AAG GGG AAA ATC COT CTG CCG AAA AAG ACC 2110

520 GCG TTT TTG TCG AAA TCA TAG CCG AAT CCG TTG GAT TGT GAC AAA ATT 2158

530 BamH I
CGC ATC C-3' 2165

FIG. 7C

150 Xho I 180
Asp Leu Glu Val Gln Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro
GAC CTC CAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT CAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT 814

160 Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT 862

170 Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Gly Leu Glu
GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT CAA CAG GGC CTG GAA 910

180 Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu
TGC ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG 958

190 Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr
AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT 1006

200 Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
GCC TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT 1054

210 Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC TCG GGT CAA GCA ACC TCA 1102

FIG. 7D

250 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala
GTC ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA GAT GAG AAA GAC GCA GCT 1150

260 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Glu Val
AAA AAA GAC GAT CCC AAA AAG GAT GAC GGC AAG AAA GAT CTT GAG GTT 1198

270 Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val
CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAT TTG GTG AAA CCT GCG GCT TCA GTC 1246

280 Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile
AAG ATT TCC TCC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT 1294

290 His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
CAC TGG GTG AAA CAC AAC CCT CAA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GCA TAT 1342

300 Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys Gly
TTT TCT CCC GGA AAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GGC 1390

310 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Val Gln
AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GGC TAC GTG CAG 1438

320 Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg
CTC AAC AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA 1486

FIG. 7F

490 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr
AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT 1870

500 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu
GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TCT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC 1918

510 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys ***
ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTT AAG TAA AAA GCT AGC GAT 1966

520 GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT 2014

530 Ser Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys ***
GAT ATC ATT GTC CCG CAA TGG TGT GGG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT 2062

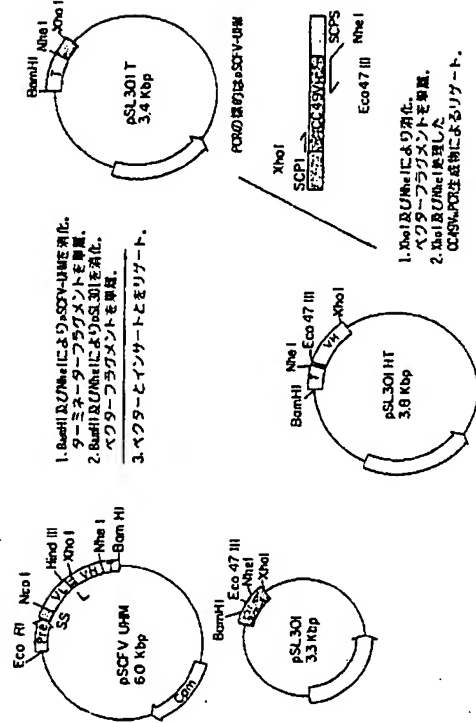
540 AAA GAT CAT GTG AAG AAA AAG GGG AAA ATC COT CTG CCG AAA AAG ACC 2110

550 GCG TTT TTG TCG AAA TCA TAG CCG AAT CCG TTG GAT TGT GAC AAA ATT 2158

560 BamH I
CGC ATC C-3' 2165

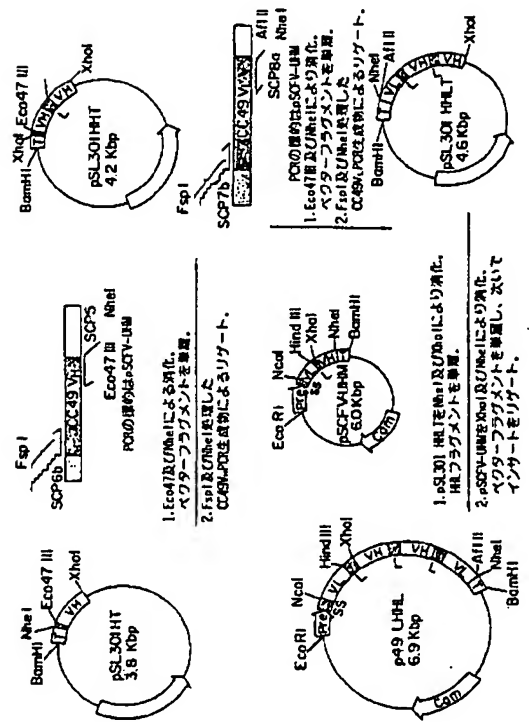
特許(内容に変更なし)

FIGURE 8



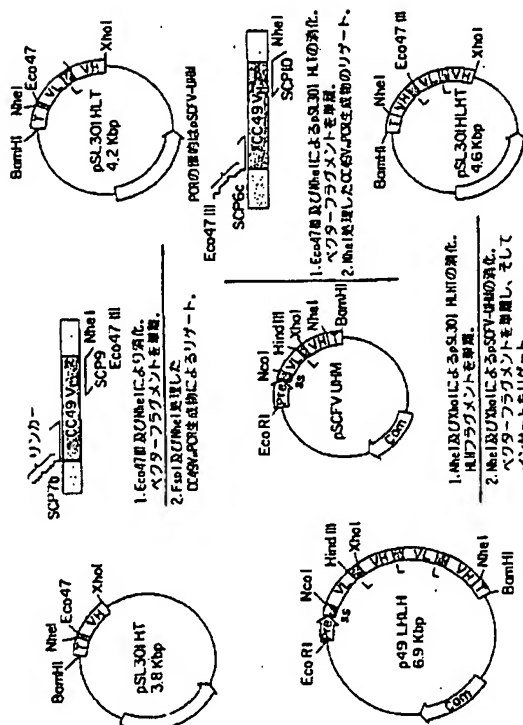
特許(内容に変更なし)

FIGURE 9



特許(内容に変更なし)

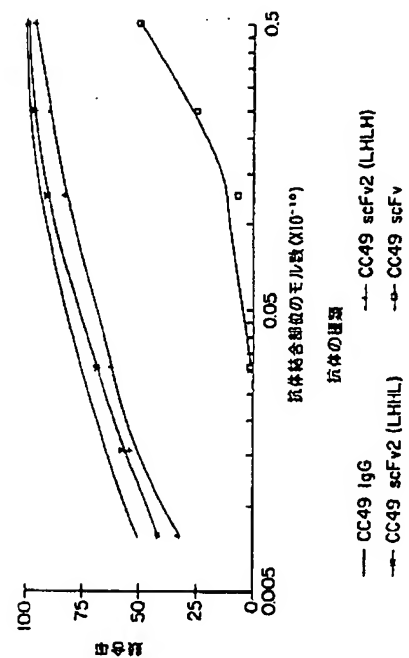
FIGURE 10



特許(内容に変更なし)

FIGURE 11

CC49 IgG, scFv2 & scFvの融合アッセイ
融合因子: ヒスチニル化CC49 IgG



平成6年 9 月 1 日

特許庁長官 高 島 章 殿

- ## 1. 事件の表示

PCT/US 93/12039

- ## 2 発明の名称

多価の一本鎖抗体

- ### 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ザ ダウ ケミカル カンパニー

- #### 4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル

實和特許法律事務所 電話 3504-0721

氏名 井田士(7751)石田 敬

- ## 5. 補正命令の日付

自免補正

- ## 6. 補正の対象

- (1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文
- (2) 図面の翻訳文
- (3) 委任状

- ## 7. 補正の内容

- (1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文の浄書（内容に変更なし）
- (2) 図面の翻訳文の浄書（内容に変更なし）
- (3) 別紙の通り

<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> INTERNATIONAL REPORTING SERVICE <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> PCT/US 93/12359 </div> </div>	
CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 5 C12N15/13 C07K15/28 C12N16/62 A61K39/395	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC 8. FIELD(S) IN WHICH THE INVENTION IS RELATED (Indicate the system concerned by subcategory if appropriate) IPC 5 C12N C07K	
Designation(s) in which this document is/has been/has not been translated: Designation(s) in which this document is/has been/has not been translated:	
Abstract data has been recorded during the international search phase of this form and, where practicable, source data and	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Division of document, with indication, where appropriate, of the part(s) pertinent Address in class No.
X	WO. A. 93 19739 (CELLTECH LIMITED) 26 December 1991 see example 1 1,5
Y	2-4,6
Y	CANCER RESEARCH vol. 52, no. 32, 15 June 1992, PHILADELPHIA, PA, USA pages 3402 - 3405 T.YOKATA ET AL. 'Rapid tumour penetration of a single-chain Fv and compare with other immunoglobulin forms' see page 3403, column 1, paragraph 4 1,6
	-/-
* Further documents are listed in the continuation of form C.	
* From family members are listed in class.	
(Special categories of cited documents) *A' document(s) relating to the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *C' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *D' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *E' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *F' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *G' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *H' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *I' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *J' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *K' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *L' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *M' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *N' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *O' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *P' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *Q' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *R' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *S' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *T' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *U' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *V' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *W' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *X' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *Y' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance *Z' document(s) which are pertinent to the state of the art but which are not considered to be of particular relevance	
Date of the latest completion of the international search 25 March 1994	
Please send complete address of the ISA International Patent Office, P.O. Box 1000, Washington, D.C. 20540 Tel.: (202) 351-3500 Fax: (202) 351-3501 Authorised officer Cupido, H	

Category		Content of documents, with abbreviations, where appropriate, of the relevant paragraph	Reference to citation No.
Y	BIOCHEMISTRY	vol. 30, no. 42, 22 October 1991, EASTON, PA US pages 10117 - 10126 M.V.PANTOLIANO ET AL. 'Conformational stability, folding and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in Escherichia coli' cited in the application see page 10120, column 1, paragraph 2	2, 4
X	EP, A. D. 506 124 (TANOK BIOSYSTEMS, INC.) 30 September 1992 see example 4		1, 8
P, X	WO, A. 93 11161 (GENZON, INC.) 10 June 1993 see figure 19A		1, 3-6

Foreign documents used in search report		Publication date	Patent family (number(s))	Publication date
WO-A-9119739	26-12-91	AU-A- EP-A- GB-A- JP-T-	7883191 0486652 2250993 5602039	07-01-92 27-05-92 24-06-92 15-04-93
EP-A-0506124	30-09-92	AU-B- AU-A- JP-A-	640363 1299292 5117164	02-09-93 15-10-92 14-05-93
WO-A-9311161	10-06-93	AU-A-	3178993	28-06-93

フロントページの続き

(51) Int. Cl. *	識別記号	序内整理番号	F I
C 0 7 K 16/46		8318 -4H	
C 1 2 N 15/09	Z N A		
//(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:19)			

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)1月13日

【公表番号】特表平7-503622

【公表日】平成7年(1995)4月20日

【年通号数】

【出願番号】特願平6-514437

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08

C07K 16/00

16/18

16/32

16/46

C12N 15/09 ZNA

//C12P 21/08

C12R 1:19)

【F I】

C12P 21/08 9358-4B

C07K 16/00 9356-4H

16/18 9356-4H

16/32 9356-4H

16/46 9356-4H

C12N 15/00 ZNA A 9282-4B

手 続 補 正 書

平成9年 7 月 2 日

明 細 書

多価の一本鎖抗体

特許庁長官 光 井 秀 光 殿

1. 事件の表示

平成6年特許第514437号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ザ ダウ ケミカル カンパニー

3. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目2番1号 虎ノ門37ビル

青和特許法律事務所 電話 03-5470-1930

氏名 弁護士(7151) 石 田 敬

4. 補正対象書類名

明細書及び請求の範囲

5. 補正対象項目名

明細書及び請求の範囲

6. 補正の内容

- (1) 明細書を別紙の通り補正します。
 (2) 請求の範囲を別紙の通り補正します。

7. 添付書類の目録

- (1) 明 細 書 1 冊
 (2) 請求の範囲 1 冊

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に反応して免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四鎖体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと二本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は二本の可変ドメインと、二本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV_L及びV_Hと称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特性性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データベースは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保守されたフレームワーク領域(FR)によりフラグメントされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保存性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特性性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると想定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは5本の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特性性を有するモノクローナル抗体は診断及び治療目的の両方として有用とされている。モノクローナル抗体は、誘導された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエロマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより巨量的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断にとってのベスト抗体の検出は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の鎖に由来する抗体の結合又は可変領域が別の鎖に出

来る抗体の定常領域と組換えられたものが従来 DNA 方法論により作られている。例えば、Sahaguchiら、J. Immunol., 137: 1060-1074 (1986) ; Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1987) ; Nishimuraら、Cancer Res., 47: 909-910 (1987) ; 及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 9439-9443 (1987) を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が著明に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その基型動力学に影響を及ぼすタンパク質構造全体のうちの主要部分を保持するFc領域を喪失している。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、療法的に迅速に集中し、且つ結合する抗原様分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管透過性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV_H と一本のV_L とにより一本鎖抗体フラグメント(scFv)が作られており、これは6つのCDRを含む。それらはペプチドリンカー（米国特許第 4,316,578号）により連結されたV_H-L_H V_L ペプチドを成しており、ここでLはペプチドリンカーを表している。V_H と V_L ドメインが両方V_H・L_H・V_L であるscFvが米国特許第 5,132,405号に開示されている。

完全抗体としての最少限の2つの軽鎖部位と比べてscFvは一つのそれを有するため、scFvは2以上の結合部位を含む抗体に比べて高い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、凡そその抗原認識特性を維持又は高めるため、複数の結合部位を有するscFvの構築を導導することが有利であろう。加えて、機能的組織上の別々のエピソードの隠蔽を可能とする、別の免疫ニフクター-抗体の抗体-ベース増強を可能とする、又は抗原もしくは抗原成分の抗体認識を可能とする二価特異的である多鎖scFvを構築することが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本のV_H と一本のV_L

ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合能力を維持している多価一本鎖抗体を形成できることが発見された。一態様において、本発明は抗原に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は2本以上の経線可変ドメインと2本以上の重鎖可変ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の態様において、本発明は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

- (a) 経線可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードする DNA 配列を発生し、ここでこの多価の一本鎖抗体は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

- (a) 経線可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいても小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が2種類の抗原決定基であらうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

図解の簡便な説明

図1は、V_H-L_H-V_H-L_H-V_L-L_H (LH23) と V_H-L_H-V_H-L_H-V_L-L_H (LH24) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型二本鎖抗体 (Fv2) を示す。

図2は CC49V_H (SEQ ID NO: 1) のヌクレオチド配列を示す。

図3は CC49V_L (SEQ ID NO: 2) のアミノ酸配列を示す。

図4は CC49V_H (SEQ ID NO: 3) のヌクレオチド配列を示す。

図5は CC49V_L (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を示す。

図6は p49LHLE (SEQ ID NO: 6) におけるCC49一本鎖抗体LHLEのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図7は p49LHLE (SEQ ID NO: 8) におけるCC49一本鎖抗体LHLEのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図8はプラスミド pSL3017及びpSL301HTの構築を示す。

図9はプラスミド p49LHLEの構築を示す。

図10はプラスミド p49LHLEの構築を示す。

図11はCC49IgG、CC49scFv2及びCC49scFvを用いた、競合図下としてジオキニル化 CC49Ig2を用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に引入れる。

糖基、アミノ酸、ペプチド、保護基、糖基基等略すとき、それらはIUPAC IU B (Commission on Biochemical Nomenclature) 又は関連分野の慣習に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv)又は「抗体フラグメント」なる語は、V_H・L_H V_L により表わされる、ペプチドリンカー (L) によりV_H ドメインに連結されたV_L ドメインを含むポリペプチドを意味する。V_H と V_L ドメインとの順序は逆であつてよく、V_L・L_H V_H として表わされるポリペプチドが獲得であろう。「ドメイン」は、独自の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した2以上の一本鎖抗体

体フラグメントを意味する。この抗原フラグメントは連結されて、

V_H・L_H-V_H-L_H-V_L-L_H V_L ; V_H・L_H-V_H-L_H-V_L ; V_H・L_H・L_H-V_L・L_H-V_L ; 又は

V_L・L_H-V_L-L_H-V_H V_H

のV_H と V_L ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチド間リンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された1又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、V_H と V_L ドメインの数は等しい。

本発明は、

V_H・L_H-V_H-L_H-V_L-L_H V_L ; 又は V_L・L_H-V_L-L_H-V_H-L_H V_H

で表わされる多価の一本鎖抗体を提供する。

V_H・L_H-V_H-L_H-V_L-L_H V_L (LH23) 及び V_L・L_H-V_L-L_H-V_H-L_H V_H (LH24) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図1に示す。非共有結合型二本鎖抗体 (Fv2) も図1に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の経線及び/又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その経線と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。選択されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的であらうか、又は別々の抗原に対して特異的であらう。

一本鎖の多価抗体についての DNA 配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起原が必要とされる。適当な DNA 配列は公共の起原から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって獲得できよう。例えば、The U.S. Department of Health and Human Servicesにより公開された KabatらのSequences of Proteins of Immunological Interest 第4版 (1991) は、今まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を提示している。

遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローニングの DNA の断片として、逆転写酵素伸介合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの起原は広範囲にわたるハイブリドマから獲得できよう。例えば、カクログATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Cu

ture Collection, 20300 Parklane Drive, Rockville Md., USA (10930) を参照のこと、その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用できる。これらの植物系及びその他の類似の種群が、可溶ドメインをコードするmRNAの組として、又はモノクローナル抗体と抗体の遺伝子決定するために抗体タンパク質を重組するように利用できよう。

抗体の可変領域は、適当な寄与動物、通常は家畜動物とそれと近縁動物にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫原は特定の抗原であるか、又はハプタンであるか、キラーホルリンベットのヘンシアン(KLH)の如きの抗原に対するこのハプタンの抗原性複合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2〜3週間毎きの免疫の1又は数回の繰り返しの注射によって好適に実施される。通常、最後の免疫の3日後、脾臓を取り出し、そしてmRNAが当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できるようにハイブリドーマを誘導するための細胞融合に利用する単細胞懸液と溶解する。

特定の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV_H及びV_Lドメインは好ましくは、1989年3月3日に公開されたPCT出願WO 89/04410及び1989年1月26日に公開されたPCT出願WO 89/00532に開示されている、免疫細胞増殖タンパク質T2抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT公開第90/04410及びWO 89/00532においてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV_H及びV_Lドメインである。CC49のV_Hをコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Lのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Hをコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図4に示すものと実質的に同じである。CC49のV_Lをコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)は図5に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを編ることが必要である。V_HとV_Lドメインを連結するための適

当なリンカーは、V_HとV_Lドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全抗体のものとの構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリンカーは、全イムノグロブリンフラグメントのV_H及びV_Lドメインが三次元構造を有して、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なものである。希望の特性を有するリンカーは、その開示内容を引用することによって本明細書に記入する米特許第4,546,778号に開示の方法により獲得できよう。この第4,546,778号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できよう。

好ましくは、V_HとV_Lドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリンカーと、2以上のscFvを連結して多価の一本鎖抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配列を有する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その優な抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように追加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PattellanoらのBlock, 30, 6117-10325(1991)に開示されている2C5Cと称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にあるIsoI部位と、他端にあるHindIII部位により限定されるコドンで理由に置かれている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである:

Leu Ser Ala-Asp-Asp-Ala-Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys-Asp-Asp-Ala-Lys Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Lys

このリンカーは一般に10〜50のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10〜30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは12〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15〜25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための免疫媒体にはプラスミド又はその他のベクターが

含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性な宿主に由来するレゾリコンとコントロール配列を含む。このベクターは通常レゾリコン部位、及び形質転換細胞の中での表現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保持している。例えば、大腸菌(*E. coli*)はpBR322を用いて容易に形質転換される(Bcliverら、Gene, 2, 95-(1977)又はSambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版(1989))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できよう。S. cerevisiae (S. cerevisiae)又は一連のパン酵母が真核微生物の中で最も一般的に利用されているが、数多くのその他の例、例えばシシアバクトリス(*Pichia pastoris*)が有用である。多細胞動物、例えばATCCより入手できるSP2/0又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できる。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドはpSV2neo及びpSV2gpt(ATCC); pSV1及びpKSV-20 (Pharmacia); pDPV-1/pMT2 (International Biotechnology, Inc.)である。

不発明のポリペプチドについての遺伝子を免疫するための類似及び異種ウイルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入部位において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域によって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアゼにより制限し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前掲に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構築物は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリペプチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その免疫細胞は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために輸送、折りたたみ及び棄出過程とつづかう。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって阻害の要素が必要とされる。これらの要素にはスプライシングナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の調節子及びその

生成物が生成及び折りたたみを助長するために必要とされる(シャペロン)。

用照されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たすように簡単に改変される。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選別できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組織DNA技術を用いて構築されたベクターにより積極的に形質転換される細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを要する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、突然変異細胞が培養細胞の中で繁殖することを防ぐうえで利用される。この態様において、かかる特異的な形質転換細胞の培養物は存在のために誘導された選択剤を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の標準技術を利用して達成される。例えば、もしそれが培養培養の中に分泌されるなら、この一本鎖の多価抗体は超外濾過により濃縮される。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、培養はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで限外濾過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及び糖度濃縮を実行することにより達成される。不溶性であり、且つ屈折体(refractile bodies)、選択的に存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を溶解するための波動と洗浄の繰り返、例えばグアニジンHClによる可溶化、及び再度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって精製される。

一本鎖の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば融合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)及びラジオイムノアッセイ(RIA)により決定される。

本発明の多価の一本鎖抗体は診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大まめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその細胞組織により迅速に到達し、そ

して身体からより迅速に排除される。

途断及び／又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は1又は複数の抗体フラグメントが恒的組織に対して特異的であるように、及び／又は複数の抗体フラグメントが途断もしくは治療因子に対して特異的であるように構築される。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び／又は治療において有用な時に好都合な薬理活性物も考慮しており、ここでこの恒的抗体はしばしば細胞の表面上で発現される。診断及び／又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療時に当業界に公知の方法によって融合される。本発明の薬理活性物は当業界に公知の方法、例えば電泳の混合、接合又は連続乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を要図する下記の実施例の考案により更に明らかにする。

略 語

BCP 5-ブロモベンゾ-1-クロロ-3-インドルホスフェート

bp 塩基対

Bis-Trisプロパン (1,3-ビス(トリス(ヒドロキシメチル)イメチルアミノ)プロパン)

BSA 牛血清アルブミン

CDR 抗原性決定領域

CLISA 酵素結合免疫吸着アッセイ

CV2 非共有一本鎖Pcダイマー

IEF 等電点電気泳動

Ibp 牛ロ垢基対

LB Luria-Bertani 培地

Mab モノクローナル抗体

MEBS 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸

MR 分子軌

NBT ニトロブルーテトラゾリウムクロリド

オリゴ オリゴヌクレオチド

PAGE ポリアクリルアミドゲル

PAGEE ポリアクリルアミドゲル電気泳動

PF5 リン酸緩衝食塩水

PCR ポリメラーゼ連鎖反応

pSCPV pSCPVをコードする DNA配列を含むプラスミド

RTGS ラジオイムノガイド外科

RT ラジオイムノ治療

scFv 一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントモノマー

scFvs 共有結合した一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントダイマー

SDS ドデシル硫酸ナトリウム

TDS トリス塩基食塩水

トリス (トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)

TDS ツイーン20洗淨液

V_H イムノグロブリン重鎖可変ドメイン

V_L イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

抗 体

CC49: ヒト胚腎間皮嚢タンパク質72(TA0-72)に特異的なモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459として寄託。

CC49Fab: 重鎖のN-末端領域に連結している完全軽鎖より成るCC49の抗原結合性断片。

CC49scFv: ペプチドリンカーにより連結されているCC49抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49v2: ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49scFv。7vの後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば、CC49v0は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2: 3つのリンカーにより連結されている、2本のCC49V_Lドメインと2本のV_Hドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V_L(L)とV_H(H)ドメインとを連結し合わせるのに6つの可能な順序の組合せがある: LHLR, LHHL, LHLR, HLRL, HLRL及びHLLR。

プラスミド

pSCPV-DNA: 25のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49の可変重鎖とCC49可変軽鎖とより成るscFvについてのコード配列を含むプラスミド。

p49LHHL又はp49LHL: CC49s:7v2 LHLHL又はLHLHL生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

実施例

一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することで本明細書に組み入れる。Sambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York第2版(1989)及びAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York(1992)に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

オリゴヌクレオチドの合成及び純度

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、塩基の5'-シアノアチルホスホニミジリット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems(Foster City, CA)由来のModel 380A又はModel 391 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、蒸水酸化アンモニウムの中で55℃で6-15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその乾燥化合物を30-40μlの蒸留水の中に再溶解させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲルでの電気泳動の後、オリゴを塩基特異的(BV)光を用いて可視化させた。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1mLの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのDTAの中で55℃で2時間かけて溶解させた。最終精製は、DNAをSepa-Pac(商標)C-18カラム(Phillipore, Bedford, MA)に適用し、そして結合したオリゴを80%のメタノールで洗脱させることによって行った。その洗脱の体積を約50mLに下げ、そしてDNA濃度を200nm(OD₂₆₀)での光密度を測定することにより決定した。

制限酵素消化

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories(Gaithersburg, MD),

New England Biolabs, Inc.(Ipswich, MA)又はBoehringer Mannheim(BN, Indianapolis, IN)の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の提供する手順に従って実施した。消化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをニチジウムブロミドで染色し、そのDNAバンドを短波UV光により可視化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ(Eaton Cartridge Corp., Chicago)の中に入れた。そしてMax Submarine電気泳動装置(Boehringer Scientific Instruments, CA)を用いて溶解させた。サンプル容量をSpeed Vac濃縮器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノール法で回収させ、そして蒸留水の中で再溶解させた。

抗原結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら、Can. Res., 46, 850-857(1986)に実質的に記載の通りに調整したTA0-72細胞を、ポリビニルクロリド96穴マイクロタイツ・プレート(Cytosol Tech Laboratories, Inc., Chantilly, VA)のウェルの上に一夜乾かきさせることで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSA及び31℃で1時間ブロックし、次いで200μlのPBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25μlの抗抗体及び25μlのビオチニル化CC49(1/20,000希釈率: 50μg/mlの濃度)をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合したTA0-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び染色強度は、余剰な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscFvによる結合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5μg/mlのCC49及び10μg/mlのCC49Fabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び／又は洗脱液とした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの阻害された1:1600の希釈率のストレプトアビジン50μl(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50μlのパラニトロフェニルホスフェート溶液(PNPP; Kierkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を加え、そして染色反応を最低20分待たせた。scFv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー(Mu-

Secular Devices Corporation, Menlo Park, CA)を用い404-450 nmでの光学密度スキャンニングにより測定した。scFv2の場合は、発色の同時低下に伴うデオチニル化CC49の割合の低下をもたらした。

SBS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SBS-PAGE分析のためのサンプル(20 μ l)を、非還元型サンプル調製バッファ Sepasol 1(Integrated Separation Systems[ISS], Natick, MA)の中で3分間煮沸することにより調製し、そして、0-20%勾配のポリアクリルアミド Gelic bi Mبالغalにその製造者の仕様書(ISS)に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置(ISS)を用い、ゲル当たり55mAで、一定の電流で約75分を行った。ゲルをクマジーブリリアントブルー R 250(Bio-Rad, Richmond, CA)の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子重量標準は予め定められており(Mid Range kit, Diversified Bio-tech, Newton Center, MA)、そして下位のタンパク質を含んでいた(ホスホリラーゼB、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オвалブミン、ラクト脱ヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、ヨウ化グルタミン酸及びナトリウム)。対応の分子量はそれぞれ85,000、55,000、43,000、38,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デブリーケートのゲルも移動した。電気泳動後、ゲルの一方を移動バッファ#1(0.3Mのトリス-HCl, pH10.4)の中で15-20分平衡にした。Immobilon P FVDF(ポリビニルデンジクロリン)膜(Millipore, Bedford, MA)をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に移動バッファ#1の中で3分平衡にした。Milliblot-SDE装置(Millipore)を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一層の移動バッファ#1を隔膜電極間の中央に載せた。Whatman 3MM 濾紙のシートを移動バッファ#1の中に浸し、そしてその電極面の上に滑らかに置いた。移動バッファ#2(25mMのトリス, pH10.4)の中に浸した別の濾紙を一夜目の上に載せた。次に濡れたFVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に置き、そして最後に移動バッファ#2(40mMのグリシン中の25mMのトリスHCl, pH10.4)の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mAの定電流流(初期電圧は8-20ボルトに調整した)を用いて30分で遂行された。

通常のプロトコールに従ったが、ただし溶液バッファ#1として、0.1Mのクエン酸ナトリウム, pH 3.0を用いた。固分を、1.0Mのトリス-HCl, pH 9.0を用いてpH7に中和した。デオチニル化反応は下記の通りに設定した。FA10 14(1 μ g、水の中で100 μ l)を100 μ lの0.1MのNa₂CO₃, pH 9.6と混合した。デオチニル化(アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mM)を、0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Biotin-X-NHS溶液(20 μ l)をFA10 14溶液に加え、そして22℃で1時間反応させた。過剰のデオチニル及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム(Pharmacia, NJ)を用いてゲル濾過により除去した。0.8ml/minの流速で、デオチニル化FA10 14は16.8minのピークで出現した。このピークを構成する兩分をプールし、そして4℃で保存し、そしてCC49V₂及びVu CDRにより決定されるCC49イディオタイプを抽出するために用いた。

等電点電気泳動(IEF)

等電点(pI)は、DNASIS(Madison, WI)を介して入手できるPROTEIN-TITRATIONという名のコンピュータプログラムを用いて決定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えてpIが得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計算はCに調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にpIを、IsogenアガラスIEFプレート、pH範囲3-10(Isogen Products, Rockland, ME)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEFを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト(限界)、20mAの電流及び10Wの定電流とした。等電点泳動は90minで完了した。IEF標準品はBioradより購入した。そのセットはフィコシアニン、グルタクト11ブリンB、半胱氨酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬イコグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3-レンチルレクチン及びナトリウムCを含み、それらのpI値は4.65、5.10、6.00、6.80、7.00、7.10及び7.50、7.80、8.00並びに8.20及び9.50である。ゲルを、PVCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

CC49抗体種の定色

ブロットした後、その膜を水の中で洗淨にすぎ、そして20mlのブロッキング溶液(トリス緩衝食塩水(TBS)中の1%の牛血清アルブミン(BSA)(Sigma, St. Louis, MO)を含有するもの)に入れた。TBSはPierce Chemical(Rockford, IL)より、牛肺粉砕粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は250mlのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を供する。これらの膜を最少限1時間、室温でブロックし、そして20mlづつ0.5%のツイーン20を浄度(TTBS)を用いて5分間3回洗った。TTBSを調整するには、0.5mlのツイーン20(Sigma)をTBSのリッター当たり混合した。使用したブローブ抗体は20mlのデオチニル化FA10 14と混合した(10 μ g/20mlの抗体バッファ)。抗体バッファは100mlのTTBS当たり1gのBSAを加えることにより作った。閉閉温度で30-60分ブローブした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を室温温度において30-60分、洗浄バッファの中で1:500希釈率のアルカリホスファターゼの複合されたストレプトアビジン(Southern Bio technology Associates, Birmingstn, AL)20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。先天的反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファ(20ml)の中で2分洗った。このバッファは、0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMのMgCl₂・H₂O, pH 8とした。アルカリホスファターゼにとっての基質を貯えるため、ニトロブルー-テトラゾリウム(NBT)クロリド(50mg, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-1-クロロ-3-インドイルホルスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-1-クロロ-3-インドイルホルスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、Promegaよりウェスタン染色剤として市販されている。染色のため、それぞれ120 μ lを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで染色液からそれらを水で洗い流した。

デオチニル化, FA10 14

FA10 14は、CC49に対して特異的な、ATCC No. CRL10256として寄託されているネズミの抗-イデオタイプ抗体(IgG2a, Kアゾグリブ)である。FA10 14をNygene Protein Aアフィニティカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。製

IgG, scFv2の種および分子量はFvを含む精製CC49抗体はすべて、混合している1.0 μ m光路長の石英製キュベット(Hellma社)およびPerkin-Elmer 07/71.5分光光度計SE23を用いて、タンパク質希釈液の280nm波長の吸収度を測定して定量した。モル吸光係数(E_m)は、各抗体について、下記式を用いて測定した。

$$E_m = (\text{Trp残基}) \times 5,500 + (\text{Tyr残基}) \times 1,340 - ((\text{Cys}) 2 \text{残基}) \times 150 - (\text{Phe残基}) \times 10$$

これらの値は、B.B.Watkinson, Advances in Protein Chemistry, 17巻, 375-378頁に記載されている情報に基づいている。

高性能液体クロマトグラフィー

CC49scFv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にタンニンまたはテフロン被覆管を用いたHPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型検出器、270nmの吸収光に設定されたUV CORD SII 2238型検出装置および2011型 SuperRac fraction collectorで構成されている。

サブユニットの脱離による型選

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、IECプログラム(pg)のプラスミド種別(pSCFVEM)；103ピコモルのプライマー；1 μ lのPerkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーワーク所在)のAmpli-Taqポリメラーゼ；10 μ lの10mM dNTPおよび10 μ lの10 \times 緩衝液(両者ともにPECキットに提供されている)；ならびに合計容積を100 μ lにするのに充分な水で構成された反応混合液で行った。PCR反応はメーカーが定温しているのとはほとんど同様にして行った。これらの反応は、PRC 8600熱サーモサイクル(thermocycler)を用いて36サイクルを行ったが、その1サイクルは、94℃で20-45秒間のDNAの解性；52-60℃で0.5-1.5分間のアニーリングおよび72℃で0.5-2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在)の330A型もしくは3610型DNA合成器で合成し次いで上記のようにして精製した。

リゲーション

1000bpのベクター DNAおよび対照として、1化学量論的当量のインサート DNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社（米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在）のT4 DNAリガーキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物（全容積20 μ L）は最初18℃でインキュベートし、次いで一夜4℃まで徐々に冷却した。

形質転換

形質転換は、100 μ LのStratagene社の大腸菌（E.coli）AG1コンピテント細胞（米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社）を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由来のDNA（1～5 μ L）を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を続けながらルリアブロス（LB）中で37℃で1時間再生させ、続いて、pSCFV10M、p49LNLもしくはp49LNLに同じ20 μ g/mLのクロラムフェニコール含有（CAM20）ルリア寒天上にプレートし、またはプラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由来のその後の構築物に用いる100 μ g/mLアンピシリン（AMP100）ルリア寒天プレート（LB+AMP100）上にプレートした。

大腸菌クローンのスクリーニング

細胞プラスミドは、Promega社（米国、ウィスコンシン州、マディソン所在）のMagieミニプレッププラスミド製造キットを用いて、梅火王（selection pressure）を維持するため適切な濃度を含有するLBブロッグ培養物から分離した。このキットはメーカーの取扱説明書にしたがって使用した。

プラスミドの検出

p49LNLおよびp49LNLと命名された2種のプラスミドを、多量の一本鎖抗体を製造するために構築した。p49LNLを含有する宿主細胞は、V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_Hで表すことができるペリペプチドを産生した。ここでV_LとV_HはCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー（L）は、下記SEQ ID NO: 5の配列を有する25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys-Asp-Ala-Ala-Lys Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Lys-Asp-Leu

p49LNLを含有する宿主細胞は、V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_Lで表すことができる

用した。陽性プローブであり、かつBamIおよびNotIによる消化物由来の207bpの遺伝子挿入断片（図8に示す958～2,055の塩基対（bp）を含有するクローンをpSL301と命名し、次いでCC49VHに対するヌクレオチド配列を含有するpSL301HTを構築するのに選択した。XbaI～BamIの制限酵素をpSL301中に配置した理由は、そのXbaIとBamIの部位間のポリリンカー領域中に存在するBca47II制限酵素の2つ以上の制限部位を除くためであった。このことは、Bca47II制限部位が、構築体中に各遺伝子領域を配置するのにユニークである必要があるV_LとV_Hの領域を挟んで構築するため設計された。各V領域がEcc47II、XbaI部位に付加されると、Ecc47IIは各場合に破壊されて、ユニーク挿入断片に入ってくる次のBca47II部位を形成した。

V_L配列は、PCR増幅の標的としてpSCFV10Mを用い、オリゴの5' SCF1と5'オリゴSCP5によってPCRで複製した。SCP1に対するDNA配列（SEQ ID NO: 10）とSCP5に対するRNA配列（SEQ ID NO: 11）は次のとおりである。

SCP1: 5' -TAAA CTC GAG GTT GAG TTG CAG CAG-3'

SCP5: 5' -TAAA GCT AGC ACCA AGC GCT TAG TGA GGA GAC GCT CAC TGA GGT-3'

下線をつけた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅されたV_H DNAを、1Mの2M、電気溶出、エタノールによる沈澱および20 μ L水への溶解によって増幅した。そのV_H配列をXbaIとNheIの制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化され残って複製されたpSL301ベクターに対するインターとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分（4 μ L）を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB+AMP100寒天プレート上にプレートした。CC49V_Hインサートを含有していることを示す数個のクローンをNotIおよびXbaI消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical (USB) 社（米国、オハイオ州クリーブランド所在）のSequence Kit、および配列決定プライマーpSL301SEQB（pSL301ベクター中、XbaI部位から57bp上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー）とCC49VHPを用いて、BKAの原形決定を行って、（CC49V_H）の配列を確認し、pSL301HT中に正しいCC49V_H配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドは

オリペプチドも産生した。ここでV_LとV_HはCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびLは上記アミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

CC49V_L-L-V_L-L-V_H（p49LNL）のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 6）とアミノ酸配列（SEQ ID NO: 7）を図8に示す。CC49V_L-L-V_L-L-V_H（p49LNL）のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 8）およびアミノ酸配列（SEQ ID NO: 9）を図9に示す。

pSL301HTの構築

pSL301HTの構築を図8に示す。バシラス・リベニファルミス（Bacillus licheniformis）のペニシリンナーゼP（penP）ターミナーターの配列を、XbaIおよびBamIで45分間消化することによって、pSCFV10Mに命名されたプラスミドから取出し、電気溶出を行った後、4.5%ポリアクリルアミドゲルから切り取り、電気溶出させ、エタノールで沈澱させ、次に、同様に製造されたベクター：pSL301（米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社）中の同じ部位に連結した。pSCFV10Mの製造手順は、1992年8月21日付け出社の米国特許第5,970,935、625号に記載されている。なおこの出願の開示事項は本願に採用するものである。一段に、pSCFV10Mは、penPプロモーターのヌクレオチド配列；207bp NcoI制限部位；CC49V_H領域；BamI制限部位；25個のアミノ酸のリンカー；図9のXbaI制限部位；CC49V_L領域；NheI制限部位；penPターミナーター；およびBamI制限部位を含有している（図8参照）。このpenPプロモーターとpenPターミナーターは、Bessisら、J.Biol.Chem., 256巻、12211～1218頁、1981年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部（3 μ L）を、LB+AMP100寒天プレート上にプレートし、次いで一度増幅させたコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。penPターミナーター、インサートを含有するポテンシャルクローンを、Pharmacia社（米国、マリランド州、ガイサースバーグ所在）のTT QuickprimeTM DNA増幅キットと、Bulowlyら、Nucleic Acid Research, 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ波によるコロニー溶解法とともに用いてスクリーニングした。プローブは、penP-XbaI-BamIターミナーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造し使

pSL301-THTおよびpSL301-HTの両方を構築するときの出発点で使用した。使用した配列決定用のオリゴをここに示す。

pSL301SEQB（SEQ ID NO: 12）およびCC49V_L（SEQ ID NO: 13）のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQB: 5' YCG TCG GAT TAG GCA AGC TTA 3'

CC49VHP: 5' -GAT GAT TTT AAA TAC AGT GAG 3'

実施例1 pSL301HTの構築

pSL301HT（5 μ g）を出発物質として用い、これをBca47IIおよびNheIで消化し、大きい方のベクターフラグメントを複製した。CC49V_H挿入フラグメントは、5'オリゴとしてSCPC6を用い、かつ3'オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって複製した。SCP6のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 14）は下記のとおりである。

SCP6: 5' -TAAA TCG GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT GGC AAA AAG CAT GAC GGC AAG AAA CAT TTT GAG GTT GAG TTG CAG CAG TCT-3'

またオリゴSCP6Bはリンカーのコーディング領域の一部（SEQ ID NO: 14のbp 8～78）を含有している。pSCFV10M中のCC49V_H領域でアニールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp 77～90由来のものである。

下線をつけた配列はXspI部位に相当する。得られたPCRインサートを複製し、XspIとNheIで消化し、次いでpSL301HT-Ecc47II-NheIベクターとのリゲーション反応に用いた（図7）。コンピテント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物（3 μ L）で形質転換を行うのに用い、LB+AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301HT生成物を示す正しい大きさのXbaI-XbaIインサートを有する2個のクローンの配列をオリゴSCP1を用いて決定し、正しい配列（SEQ ID NO: 15）を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SCP1のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 15）は下記のとおりである。

SCP1: 5' -TC ACT TTA GCT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカーV_Lサブユニット（bp1544～1663、図7）は、5'オリゴのSCP7と3'オリゴのSCP8を用い、かつPCRの標的としてpSCFV10Mを用いて製造

した。SCP7cのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記のとおりである。

SCP7b: 5'-TAA TGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA CAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT
GCC AAA AAG GAT GAG GGC AAG AAA GAT CTT GAT ATT CTG ATG TCA CAG TTT
CC

下線をつけたヌクレオチドは Fsp I 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記のとおりである。

SCP8a: 5'-TAAA GGT AGC TTT TTA CTT AGC CAC
CAG CTT GGT GGC-3'

下線をつけた最初の二塩は Nhe I 部位に相当し、もう一つの塩は Afl II 部位に相当する。SCP7dのヌクレオチド8〜70はリンカーをコードし(図7のヌクレオチド154〜161)、一方V₁にアニールするヌクレオチド77〜93は図7の1013〜1035に相当する。プライマー SCP8aは、その3'末端の短いチロリン、Nhe I 制限部位、終止コドン、Afl II 制限部位およびV₁の最後の2個の塩基を含有している。Fsp I と Nhe I による消化の後、この得られた420bpのインサートを精製して精製pSL301HLTベクターの Nhe I と Eco47IIIの部位に連結し、最終的なクロノンを Nhe I と Iba I でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつpSLPR2(-)とSQP1で配列が決定されて、pSL301HLT中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18)は下記のとおりである。

49LPR2(-): 5'-CTG CTG GTA CCA GGC CAA G-3'

プラスミドpSL301HLTを Nhe I および Nhe I で消化し、精製し、得られた1376bp V₁、リンカー、V₁、リンカー、V₁のセグメントを pSCFV UHMに連結してp49LHLHを製造した。なおこのpSCFV UHMは同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応生成物(4μl部分)を用いてコンピテント大腸菌AG1186株(Stratagene社)を形質転換し、LB-CA220寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素増殖を有するプラスミドを含有する単クローンを、p49LHLHを含有させるために選択した。p49LHLHは、GC49多価一本鎖抗体 scFv2: V_L-L₁-V_H-L₂-V_L-L₃。またはGC49scFv2 (LHLH)のpnpプロモーターとヌクレオチド配列を含有している。

りは次のステップで修正され、オリゴSCP9C (SEQ ID NO: 21)の末端に5塩基の欠失を組込むことによってpSL301HLTを製造した。

SCP9C: 5'-TAAAGGCTGATGATGCTAAGAGGAGCGCCGCAAAAA
GCACACCCCAAAAAGATGATGCAAAAAGATGCTGG
AGGCTTCAATTCAGAGCACTGAC-3'

SCP9C中の下線をつけた配列は Eco47III部位に相当する。PCRにおいて、SCP6Cは5'オリゴとして用いられ一方SCP16は3'オリゴとして用いられ、リンカー GC49V₁セグメントが生成する。SCP16のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 22)はV₁のとおりである。

SCP16: 5'-TAA TGC TAG CTT TTT ATG AGC AGA GCG TCA
CTG AGG TT 3'

SCP10中の下線をつけた配列は図6のヌクレオチド1958〜1963に見られる Nhe I 部位に相当する。この場合、PCRインサートは Nhe I だけで消化されたいで精製される。ベクター(pSL301HLT)は Eco47III部位(先に形成されている)および Nhe I 部位で消化されたいで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3μl)を使ってコンピテント E. coli AG1186細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMP100プレート上にプレートし次いで候補的クローンを Nhe I と Nhe I でスクリーニングした。正しい大きさの DNA を有する5個のクローンを得た。これらのクローンのうちの2個は、オリゴ49V₁CDR3(-)およびSQP1を用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(49V₁CDR3(-)の SEQ ID NO: 23)は下記のとおりである。

49V₁CDR3(-): 5' CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図6のヌクレオチド1958〜1963からの配列が確認され、正しいpSL301HLTクローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHLHを製造するために、pSL301HLT(5μg)を Nhe I と Nhe I で消化し、次いで V_L-L₁-V_L-L₂-V_L配列を含有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCFV UHM(5μg)を Iba I と Nhe I で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部(4μl)を使ってコンピテント大腸菌AG1186株

を形質転換した。

オリゴの SCP7bと3'オリゴのSCP9で製造した。

SCP9: 5'-TAA AGC TAG CAC CAA GCG CTT AGT TTC
AGC ACC AGC TTG CTC CCA G 3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド8〜70)は図6のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124〜1192に相当する)および図6のV₁のヌクレオチド1169〜1215に相当する。PCRに対する pSCFV UHM断片(ヌクレオチド77〜93)にアニールした。

SCP9は、Nhe I 部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)と Eco47III部位(第二の下線をつけたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次のV領域を受けるための pSL301HLTを作るのに必要で制限部位である。SCP9のヌクレオチド18〜23は図6のヌクレオチド1002〜1007(リンカーの最初の2個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド24〜40は、PCRにおけるSCP9(SEQ ID NO: 19)のアニール領域である図5に示すヌクレオチド1508〜1531に相当する。プラスミドpSL301HLTを Eco47IIIと Nhe I で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予め Fsp I と Nhe I で処理され精製された、PCRからのリンカー GC49V₁ DNA インサートと連結させる。その連結混合物(3μl)を用いて大腸菌AG1186株を形質転換し、次いで正しい Nhe I と Nhe I の大きい方のフラグメントを有する一つのクローンの配列をオリゴ pSLPR2(-)を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 23)は下記のとおりである。

5' TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G 3'

配列決定の結果は、得られたpSL301HLTクローン中に PCRの誤りや欠失があるということを示した。図6にみられるヌクレオチド1533〜1537に相当する5塩基の塩基の欠失がみとめられ、そしてTであるべきはずのヌクレオチド1531は DNA配列のデバックから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5' ...CAAGGCTT ...であった。

こで下線をつけた配列は偶然に Eco47III部位を形成した。図6のAGGCTの配列はヌクレオチド1530、1531、1532、1533、1539および1540に相当する。この例ま

細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物をLB-CA220プレート上にプレートし、次いで p49LHLHに対する選択的なクローンを、正しい制限酵素増殖(図10参照)および TAG T2に刻する生体活性に基づいて選択した。

実施例3 GC49 scFv2のLHLHとLHLLが共有結合した二量体の精製

GC49の共有結合した一本鎖二量体(scFv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ膜成分を、p49LHLHとp49LHLLの両方の1.3μlの第一鎖断片から調製した。精製すると、培養物を250μlづつの4部分に分割し、Sorvall GS-3ロータで10分間5300rpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaClを含有する10mMトリス-HCl pH 7.3からなる100μl中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計100μlの50mMトリス-HCl pH 8.3で洗浄し、そして一つのチューブにプールした。このチューブで、40w/v%のスクロースを含有する30mMトリス-HCl pH 7.3(100μl)および10mM EDTA pH 7.3(2.5μl)を添加した。得られた混合物を、時々振盪しながら、空室に10分間保持した。再活性細胞(Extantive cell)を同様のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mlの水(0.5mM NaCl)中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら氷上に10分間保持した。その細胞を同様のようにしてペレット化し、大腸菌の両鎖細胞質の成分を含有する上澄み液を、0.2μmの Nalgene社(米国、ニュージャージー州、ロチェスター所在)の透過装置で濾過することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)のCentrifuge 30およびCentrifuge 30で1.6mlより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLHまたはp49LHLLのクローン由来の両鎖両細胞質のシェケット(shock)を、Pharmacia社(米国、ニュージャージー州、ピスカタニイ所在)のSuperdex T5 HR 10/30 BPLC カラム(予めP33で平衡化させたもの)に注入した。結合 ELISA法で測定する場合、問題の生成物は0.5μl/分の流量で2〜24分間洗脱させた。活性成分をプールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、Shimadzu 500 Microdialyser Unit(Pierce Chemical社)を用い、緩衝液を3〜4回交換しながら8000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.6に対して一度透析を行った。その試料をPharmacia社のHewlett-Packard 5/5アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、緩衝液Bとして

て20Mトリス-HCl pH 7.6に0.5M NaCl を含める勾配プログラムを、1.5ml/minの流量で使用した。同様の生成物は、結合 ELISA法で測定する場合、各々3〜4分間カラムから放出させた。この時点の両方の、二つの SDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクマーマープリリアントブルー3250で染色し、他方のゲルはウエスタン分析（ブローブ抗体としてビオチニル化 PAID-14を使用）に移されたが、scFv2(LHLHまたはLHHL)の種の計算分子量の単一バンドが、55,239ダルトンの位置に出現した。活性成分は各場合濃縮し、50mM MES pH 5.8に対して一夜透析し、次いで Pharmacia社のMono S HR 5/5カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの問題の二つの百分の5と6は、SDS-PAGE および ELISA法で測定する場合、勾配液の効果が開始される直前に放出された。したがってこれらの百分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで百分5と6はさらに精製するためにブールした。

Mono Qカラムを活性Mono S柱分について再度使用したが使用した緩衝液は20mMトリス-HCl pH 8.0であり、流量は0.8ml/minに低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分電は5〜6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

等電点電気泳動

精製物の等電点 (pI) は DEXSTAR社 (米国、ワシントン州、マディソン所在) のコンピュータプログラム Protein-elutrateを使用して予測した。アミノ酸組成、およびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、PNC Bioproducts社 (米国、マーン州、ロックランド所在) のImmol IEPプリントpH範囲3〜10を使用して測定した。上記 IEPを操作するために、Biorad社 (米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在) の電気泳動装置を、上記メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで500V (限定) および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は30分間で完了した。Biorad社の IEP標準品は、フィコシアニン、βラクトグロブリン、ウシカルボニクタンヒドラーゼ、ヒトカルボニクタンヒドラーゼ、ウミイオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のドラマメンタンおよびシトクロム

Cが含有され、pI値はそれぞれ4.55、5.13、6.00、6.59、7.09、7.50、7.8、8.0、8.20 および 9.6であった。ゲルは FMCの指示にしたがって染色し脱色した。DEXSTAR プログラムによって両方の scFv2の種のpI値として 9.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の 0.5の位置にみとめられた。

IgG, scFv2 (LHLHおよびLHHL) のような精製IgG抗体は、280nm波長の吸光度を分光学的に測定することによって定量化した。モル吸光係数値は、各々、先に引用した Wellawferの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG, CC49scFv2:LHLH, CC49 scFv2:LHHLおよびCC49scFv2のモル% (280nm)値はそれぞれ 1.49、1.65、1.65 および1.71であった。

実験例4

CC49scFv2の種のLHLHとLHHLの相対活性を、IgGおよびC0001抗体にFLAGペプチドを有する単量体scFv型と比較した。

パーセント競合 (percent competition) を下記式によって ELISAのデータから求めた。

$$\text{ゼロ競合} = \frac{\text{試料採取り値 (OD 405-450nm)}}{\text{ゼロ競合} - 100\% \text{競合}} \times 100$$

"ゼロ競合 (zero competition)" 値は、1% BSAをビオチニル化CC49 (3×10〜14モル) と 1:1比率で混合して測定し、一方 100%競合はビオチニル化 C C49IgGと混合した CC49IgGの 5 μg/ml試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は 405nm〜450nmで測定した。3回の採取り値の平均値を使用した。最初に試料 (25 μL) を、TAG-72でコートしたマイクロリットルプレートに、1.0×10¹⁰ μLの結合部位/μLで塗布した。ビオチニル化CC49 (4 μg/μL 1:20,000に希釈、25 μL使用) で試料を1/2濃度に希釈した。逆転染法 (1:2) を行った。両方の形態の scFv2は IgGには4等しい (図11参照)。別の試験で、CC49scFv単量体を Pabフラグメントと比較した。両者は一価であるが、これらは TAG-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に

機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の値に比べて全 IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、その CC49IgGの型と同等に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および腫瘍血管形成促進作用の利点を有することを示している。この利点によって、既述の scFv分子に比べて、本発明の化合物は多量回注射することができ、かつ腫瘍内に用いる免疫治療法において腫瘍組織に高くすることができる。

本発明の他の実施態様は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の範囲は図面を参照して以下の請求の範囲によって示される。

以 上

請求の範囲

1. 2本以上の一本抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第1のペプチドリンカーを介して共有結合されており、この第1のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys
Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu

を有し、

そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド;及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結させる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、多価の一本抗体。

2. 前記抗体可変領域が下記の配列

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val
Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Asp Tyr Gln Gln Lys
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

と實質的に同じアミノ酸配列を有しており、そして前記軽鎖可変領域が下記の配列

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr

Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp
Cly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

と実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

3. 前記第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

4. 多価の一本鎖抗体をコードする DNA 配列であって、この多価の一本鎖抗体が2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する特異性を有しており、ここでそれぞれのフラグメントは前記のペプチドリンカーを介して共有結合されておき、そして各フラグメントは:

(a) 抗原可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;

(b) 抗原可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド;及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機械的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、DNA配列。

5. 前記第一ポリペプチドをコードする配列が下記の配列:

GAC ATT CTC ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG CCA
CTT GCC CAG AAG CTT ACC TTC AGC TCC AAG TCC AGT CAG AGC
CTT TCA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC
CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CTT AAA CTC CTG ATT TAC TTG
GCA TCC GGT ACC CAA TCT CGG GTC CTT GAT CGC TTC ACA GGC
AGT GGA TCT GGG ACA CAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG
AAG ACT GAA GAC CTG GCA GGT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT
AGC TAT CCC CTC ACG TTC GGT GGT GGG ACC AAG CTG GTG CTG
AAG

と実質的に同じであり、そして前記第二ポリペプチドをコードする配列が下記の配列:

GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT
GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TCC AAG GCT TCT GGC TAC ACC
TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC GGT GAA
CAC GCG CTC GAA TCG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT
GAT TTT AAA TAC AAT CAG AGG TTC AAG GCG AAG GCG ACA CTG
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT CCC TAC GTG CAG CTC AAC
AGC CTC ACA TCT GAG GAT TCT GCA GCG TAT TTC TGT ACA AGA
TCC CTC AAT ATG GCG TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC
GTC TCC TCA

と実質的に同じである、請求項1記載の DNA配列。